

Aus dem Institut für Rechtsmedizin
der Universität Erlangen – Nürnberg
Direktor: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling

Die Toxizität der Organo-Phosphate EPN und DICAPTHON

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen – Nürnberg

vorgelegt von
Robert Schulze
aus
Nürnberg

1980

Die Toxizität der Organo-Phosphate EPN und DICAPTHON

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen – Nürnberg

vorgelegt von
Robert Schulze
aus
Nürnberg

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen Fakultät
der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. W. Kersten
Referent: Prof. Dr.Dr. M. Geldmacher-v. Mallinckrodt
Korreferent: Prof. Dr. H.-B. Wuermeling
Tag der mündlichen Prüfung: 18.11.1980

Inhaltsverzeichnis

Seite

A) <u>EINLEITUNG</u>	5
Geschichtliche Entwicklung der Organophosphor- säureester	
B) <u>EPN</u>	7
1. Synthese des EPN	7
2. Toxizität des EPN	11
3. <u>Interaktionen des EPN mit anderen chemischen Mitteln</u>	20
a) Synergismus EPN/Malathion und ähnliche Wirkungssteigerungen	20
b) Ursache der Wirkungssteigerung des Malathion durch EPN	29
4. Verzögerte neurotoxische Wirkung des EPN	36
5. Teratogenität des EPN	51
6. Anwendung des EPN	51
7. <u>Wirkungsmechanismus von EPN</u>	56
a) Die anticholinerge Wirkung des EPN	56
b) Hemmung der Aliesterasen durch EPN	63
c) Hemmung der Monoaminoxidase durch EPN	74
d) Mechanismus der verzögerten neurotoxischen Wirkung des EPN	76
8. <u>Metabolismus des EPN</u>	80
a) Oxidation und Hydrolyse	80
b) Enzymatische Reduktion der Nitrogruppe des EPN	89
9. Stimulierung der Detoxikation des EPN	93

C)	<u>DICAPTHON</u>	101
	1. Synthese des Dicapthons	101
	2. Acute Toxizität des Dicapthons	103
	3. Neurotoxische Wirkung des Dicapthons	105
	4. Anwendung des Dicapthons	106
	5. Wirkungsmechanismus des Dicapthons	107
	a) Anticholinerge Wirkung des Dicapthons	107
	b) Hemmung anderer Enzymsysteme durch Dicapthon	110
	6. Metabolismus des Dicapthons	110
D)	<u>KLINIK, THERAPIE UND PROPHYLAXE BEI VERGIFTUNGEN MIT ORGANOPHOSPHATEN</u>	111
	1. Vergiftungen durch EPN und Dicapthon beim Menschen	111
	2. Therapeutische Maßnahmen nach Vergiftungen mit Organophosphorsäuren z.B. EPN und Dicapthon	115
	3. Möglichkeiten zur Verhütung acuter und chronischer Vergiftungen	116
E)	<u>DISKUSSION</u>	118
F)	<u>ZUSAMMENFASSUNG</u>	127
G)	<u>LITERATURVERZEICHNIS</u>	128

A) EINLEITUNG

Geschichtliche Entwicklung der Organophosphorsäureester

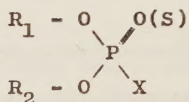
Die Chemie der organischen Phosphorsäureverbindungen reicht bis in die Mitte des 19. Jahrhunderts zurück. 1847 entdeckte M. Cloez Thiophosphorsäureester. Im Jahre 1854 wurde von Ph. De Clermont Pyrophosphorsäuretetraäthylester (TEPP) synthetisiert. Diese Synthese - Alkylierung des Silbersalzes der Pyrophosphorsäure mit Alkylhalogeniden - nennt man Clermont-Methode (FEST und SCHMIDT 1970).

Die bedeutende physiologische Wirksamkeit dieser Verbindung wurde aber damals nicht erkannt. Diese Wirkung, und damit die Möglichkeit, diese Organophosphorsäuren als Insektizide einzusetzen, wurde erst circa 80 Jahre später entdeckt.

Zwischenzeitlich wurde aber systematisch auf diesem Gebiet geforscht: Hier sind die Namen A. Michaelis - er lehrte von 1876 bis 1916 an den Technischen Hochschulen Karlsruhe und Rostock - und A.E. Arbusow zu erwähnen.

Die moderne Entwicklung der Phosphorsäureester und ihrer Anwendung als Insektizide ist unlösbar mit dem Namen Schrader, dem Entdecker des E 605, verbunden. Schrader hat zusammen mit seinem Mitarbeiter W. Lorenz während des Zweiten Weltkrieges die hervorragenden insektiziden Eigenschaften der Phosphorsäureester erkannt. 1944 synthetisierte er das E 605.

Die Grundstruktur der Phosphorsäureester ist nach SCHRADER (1952)



wobei für R_1 und R_2 vorwiegend der Rest des Methyl-, Äthyl- und Isoprophylalkohols in Frage kommt. X stellt den aziden Rest dar. Von dieser Grundstruktur ausgehend wurde im Laufe des nächsten Jahrzehntes systematisch weitergeforscht und unzählige neue Phosphorsäureester synthetisiert z.B. Potasan, Systox, Dimethylparathion, Malathion, Fenthion, Demeton.

Man versuchte auch Ester zu finden, deren Warmblüter-Toxizität verringert, deren Toxizität gegen Insekten aber unverändert hoch ist.

Hierbei wurde 1948 von Jelinek der Phosphonsäureester EPN (O-Äthyl-O-(p-nitrophenyl)-Phenylthionophosphonsäureester) synthetisiert. Er kam als erster Phosphonsäureester 1949 in den Handel. Im Jahre 1954 wurde von der American Cyanid Co. das Dicapthon eingeführt (O,O-Dimethyl-O-(2-chlor-4-nitrophenyl)-Thionophosphorsäureester).

B) EPN

1. Synthese des EPN

Die Synthese der Phosphorsäureester im großtechnischen Maßstab ist noch nicht alt. Ihre Entwicklung begann erst nach dem Zweiten Weltkrieg mit zunehmender Bedeutung der Phosphorsäureester als Insektizide in der Landwirtschaft. Die großtechnische Synthese ist auf einige wichtige Phosphorverbindungen angewiesen. Anhand des folgenden Schemas (siehe Abb. 1) kann man sich die einzelnen Syntheseschritte und Zwischenprodukte verdeutlichen. Später sollen insbesondere diejenigen Schritte, die zur Synthese des EPN führen, genau erklärt werden.

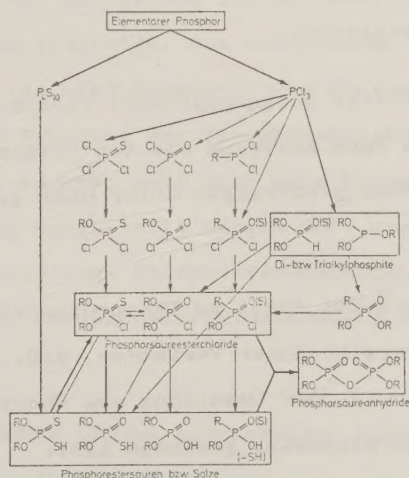
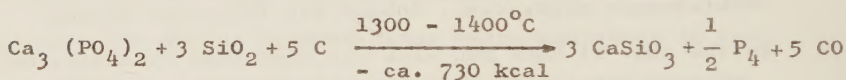


Abb. 1

Schematischer Syntheseweg wichtiger Phosphorverbindungen bei der Insektizidherstellung (FEST und SCHMIDT 1970)

Als Ausgangspunkt der Synthese jedes Phosphorsäureesters benötigt man elementaren Phosphor. Die Phosphorherstellung liegt in Deutschland vollkommen in Händen der Knap-sack AG. Der elementare Phosphor wird im elektrischen Schachtofen unter Zusatz von Kieselräure durch Reduktion von Phosphaten mit Kohle gewonnen. Die Gesamtreaktion lautet:



Das erste wichtige Zwischenprodukt P_4S_{10} wird in einem Verfahren hergestellt, bei dem anteilige Mengen Phosphor und Schwefel bei 350°C in flüssiger Form unter Schutzgas miteinander reagieren.

Das zweite wichtige Ausgangsprodukt Phosphortrichlorid PCl_3 läßt sich auch exotherm aus den Elementen gewinnen; man führt hierbei gasförmiges Chlor über geschmolzenen Phosphor.

Ein weiterer Schritt führt zu Phosphoroxychlorid, das sich mittels verschiedener Verfahren, z.B. Oxidation von Phosphortrichlorid oder Umsetzung von Phosphorpentachlorid mit Phosphorpentoxid, gewinnen läßt.

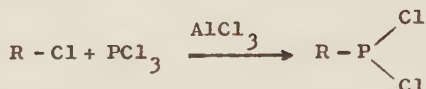
Die Synthese des analogen Thiophosphorsäurechlorids bereitet mehr Schwierigkeiten. Eine großtechnischen Her-

stellung gelang erst nach einem 1939 angemeldeten Deutschen Reichspatent (DRP 675303 - 1937/1939). Nach diesem Verfahren wird PCl_3 in Dampfform bei 140°C über dünnflüssigen Schwefel geleitet. Hiermit wurde eine kontinuierliche Produktion von PSCl_3 möglich. Die Ausbeute dieses Verfahrens konnte man später noch durch die Verwendung von Katalysatoren, wie Aktivkohle, verbessern. Der nächste Schritt, die Synthese der Phosphor- und Phosphoresterchloride kann durch mehrere einfache Grundreaktionen durchgeführt werden.

Bei Phosphoresterchloriden geht man von Phosphoroxychlorid aus und setzt dieses mit Alkoholen um (z.B. Methanol, Äthanol). Nur bei Entfernung des HCl entstehen aber einheitliche Dialkylchloride. Die bedeutenden Vertreter dieser Esterchloride sind Dimethyl- und Diäthylphosphorsäurechlorid. Die Synthese der Phosphonsäurehalogenide verläuft zunächst anders, weil hier eine Phosphor-Kohlenstoffverbindung hergestellt werden muß. Ausgangsmaterial sind meist dreiwertige Phosphorverbindungen. Die Synthese führt dann über Phosphonsäuredihalogenide zu Monohalogeniden.

KINNEAR und PERREN (1952) entwickelten hierfür einen Weg, der in der Technik bevorzugt wird.

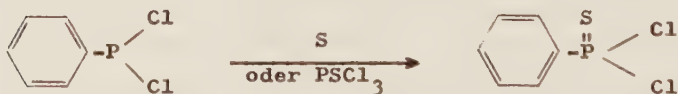
Phosphortrichlorid, Alkyl- bzw. Arylhalogenide und AlCl_3 werden umgesetzt:



Es entsteht Aryl- oder Alkylphosphordichlorid. Setzt man für R einen Benzolring, so erhält man Benzolphosphorchlorid.

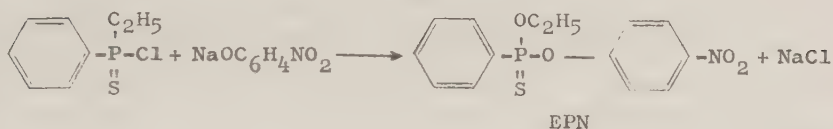
Dieses wird weiter aufgearbeitet.

Man kann es zu Thionophosphonsäurehalogeniden schwefeln, entweder mittels elementarem Schwefel oder PSCl_3 :



Dieses Benzolthiophosphonsäuredichlorid ist dann Ausgangsprodukt zur Herstellung von EPN (O-Äthyl-O-p-nitrophenylthionophosphonsäureester).

Benzolthiophosphonsäuredichlorid wird zuerst mit Na-Alkoholat oder Alkohol in Gegenwart säurebindender Mittel behandelt. Anschließend wird das zweite Chloratom durch den p-Nitrophenylrest ersetzt.



EPN hat die Summenformel $\text{C}_{14}\text{H}_{14}\text{O}_4\text{NP}$ und ein Molgewicht von 323,2. Der Schmelzpunkt von reinem EPN liegt bei 36°C .

Die technische Wirksubstanz fällt als viskoses gelbes Öl an, ihr Geruch ist unangenehm. EPN ist praktisch unlöslich in Wasser, es löst sich leicht in den gebräuchlichen organischen Lösungsmitteln (PERKOW 1968, FEST und SCHMIDT 1970, GUNTHER und BLINN 1955).

Gegenüber dem Parathion ist bei EPN im Formelbild eine Äthoxylgruppe $\text{C}_2\text{H}_5\text{O}$ gegen den Phenylrest C_6H_5 ausgetauscht. Die Regel, daß das zentrale Phosphoratom 2 Alkoxylgruppen trägt, wurde das erste Mal durchbrochen.

2. Toxizität des EPN

Um die Gefährlichkeit toxischer Organophosphate gegen Mensch und Tier abschätzen zu können, sind Tierversuche unabdingbar notwendig. Als Toxizitätsgrad wird allgemein die LD_{50} angegeben, d.h. bei dieser Dosis sterben 50 % der Versuchstiere innerhalb eines bestimmten Beobachtungs-

zeitraumes, meist 24 Stunden.

Die LD₅₀ von EPN läßt es zu, EPN mit anderen Organophosphaten zu vergleichen und seine Toxizität, das heißt Gefährlichkeit, abzuschätzen. Es können aber nur LD₅₀ Werte miteinander verglichen werden, die in ähnlichen Versuchen erhalten wurden (z.B. gleiche Spezies, gleiche Applikationsart).

Die LD₅₀ von EPN und auch aller anderen Organophosphorsäuren sind von folgenden Parametern abhängig:

1. Weg der Aufnahme (peroral, subcutan, cutan, intraperitoneal, intravenös)
2. Zubereitung des EPN (z.B. Lösung)
3. Tierart, mit dem der Toxizitätstest durchgeführt wurde (Artspezifität)
4. Geschlecht der verwendeten Tiere (Geschlechtsspezifität)
5. Individuelle Abhängigkeit (unterschiedliche Toxizitätswirkung bei verschiedenen Tieren gleicher Art und gleichen Geschlechts)
6. Konversionsrate des EPN in sein sauerstoffanalogen EPN-O
7. Hydrolyse des EPN

JARCZYK (1966) weist auf den Zusammenhang der Toxizität eines Organophosphorsäureesters und dem Verhältnis der enzymatischen Oxidation zur enzymatischen Hydrolyse hin:

$$\text{Toxizität} = \frac{\text{enzymatische Oxidation}}{\text{enzymatische Hydrolyse}}$$

Eine verminderte Empfindlichkeit gegen EPN bedeutet danach, daß der Quotient durch vermehrte Bildung von Abbauenzymen zugunsten der Hydrolyse verschoben ist.

Dies wurde nach Anwendung von EPN bei Insekten beobachtet. Es entwickelte sich eine Resistenz:

1951 bei *Aedes sollicitans* (KELLER und CHAPMANN 1953)

1955 bei *Glyptotendipes paripes* (LIEUX und MULRENNAN 1956)

Seit der Entwicklung des EPN wurden viele Toxizitätstests durchgeführt, um die LD_{50} zu ermitteln. Eine Übersicht der ermittelten Werte gibt folgende Tabelle 1:

Tabelle 1: Toxizität des EPN gegenüber mehreren Tieren

Testtiere	Applica- tionsart	LD ₅₀ mg/kg	berichtet bei
Ratten	p.o.	15	Fisher u. Walzer 1961
männl. Ratten	p.o.	36-91	Dubois 1963, Gaines 1960 Frawley u. Mitarb. 1952, Hodge u. Mitarb. 1954
ausgewachsene männl. Ratten	i.p.	26	Arthur u. Casida 1957
männl. Ratte	i.p.	64,0	Dubois 1963
entwöhnte männl. Ratten	i.p.	5,9	Arthur u. Casida 1957
weibl. Ratten	p.o.	7,7-14,5	Frawley u. Mitarb. 1952, Gaines 1960, Hodge u. Mitarb. 1954
weibl. Ratte	i.p.	7,2	Dubois 1963
ausgewachsene weibl. Ratte	i.p.	7,8	Arthur u. Casida 1957
entwöhnte weibl. Ratten	i.p.	5,0	Arthur u. Casida 1957
Mäuse	p.o.	45,5	Frawley u. Mitarb. 1952
Mäuse	i.p.	16	Ohkawa u. Mitarb. 1977
Meer- schweinchen	p.o.	79	Frawley u. Mitarb. 1952
Hennen	p.o.	10 (85% EPN)	Abou-Donia u. Graham 1978
Hennen	i.p.	17	Ohkawa u. Mitarb. 1977
weibl. Kaninchen	perkutan	90-150*	Hodge u. Mitarb. 1954
männl. Kaninchen	perkutan	30 - 50*	Hodge u. Mitarb. 1954

*) Niedrigster Wert ist die höchste Grenze, bei der alle Tiere überleben; höchster Wert ist die niedrigste Grenze, bei der alle Tiere sterben.

In Tabelle 2 wird die LD₅₀, also die Toxizität der drei Organophosphorsäuren EPN, Parathion und Malathion verglichen.

Testtiere	Applica- tionsart	LD ₅₀ mg/kg EPN	Autoren	LD ₅₀ mg/kg Parathion	Autoren	LD ₅₀ mg/kg Malathion	Autoren
weibl.Mäuse	i.p.	48	Dubois 1963	9,5	Dubois und Mitarb.1949	610	Vrbovsky und Mitarb. 1959
männl.Ratte	i.p.	64	Dubois 1963	7	Dubois und Mitarb.1949	400	Vrbovsky und Mitarb. 1959
weibl.Ratte	i.p.	7,2	Dubois 1963	2-4	Dubois und Mitarb.1949, Dubois 1963		
männl.Ratte	p.o.	36-91	Dubois 1963, Frawley und Mitarb.1952, Gaines 1960, Hodge und Mitarb.1954	5-30	Hazleton 1955	533-1375	Gaines 1960, Hazleton 1955, Hazleton und Holland 1953
weibl.Ratte	p.o.	7,7-14,5	Frawley und Mitarb.1952, Gaines 1960, Hodge und Mitarb.1954	1,8-6,0	Dubois und Mitarb.1949, Frawley und Mitarb.1952, Gaines 1960, Hazleton und Holland 1950,	739-1400	Gaines 1960, Hazleton 1955, Hazleton und Holland 1950, Vrbovsky und Mitarb. 1959

1974 führte PALMER eine toxikologische Studie über die toxische Wirkung des EPN bei Kälbern, einjährigen Rindern und bei Schafen durch. Er gab EPN in verschiedenen Dosen peroral.

Als maximale nicht toxische Dosis ermittelte er 1 mg/kg EPN bei Kälbern und 10 mg/kg EPN bei Rindern und Schafen. Die minimale toxische Dosis betrug 2,5 mg/kg bei Kälbern und 25 mg/kg bei Rindern und Schafen. Hier war die Aktivität der Cholinesterase immer gehemmt, wohingegen bei der maximal nicht toxischen Dosis nur bei einzelnen Rindern und Schafen eine Aktivitätshemmung bemerkt wurde. Außerdem wurde festgestellt, daß die Biotransformation des EPN bei den einzelnen Tiergruppen unterschiedlich ist. Die Vergiftungserscheinungen traten bei Schafen zwischen 4 bis 7 Stunden nach Gabe von EPN auf, bei Kälbern annähernd nach 24 Stunden und bei Rindern zwischen einer Stunde und 23 Stunden nach Gabe von EPN.

RADELEFF und Mitarbeiter führten 1957 eine ähnliche Studie durch. Die von ihnen festgestellte minimale toxische Dosis betrug 1 mg/kg bei Kälbern (PALMER 2,5 mg/kg). Für Schafe ermittelten sie eine Letaldosis von 20 mg/kg EPN. Bei PALMER (1974) wurde einer Gruppe von 5 Schafen 25 mg/kg EPN gegeben; bei dieser Dosis zeigte aber nur 1 Schaf Vergiftungserscheinungen.

Da das Molekül des EPN ein asymmetrisches Phosphoratom enthält, sind Stereoisomere möglich, das (+) -EPN (rechtsdrehend) und das (-) -EPN (linksdrehend). Diese Stereoisomere und das Racemat wurden 1977 von OHKAWA und Mitarbeiter auf ihre Toxizität gegen Mäuse, Hennen und Insekten geprüft.

OHKAWA und Mitarbeiter (1977) beobachteten folgende Werte und Abhängigkeiten der LD_{50} von EPN (siehe Tabelle 3).

Tabelle 3: Toxizität von Racemat, (+) und (-) -EPN gegen Mäuse, Hennen, Hausfliegen und Rice stem borer Larven (*Chilo suppressalis* "Reisstengelbohrer")

	LD ₅₀ mg/kg		LD ₅₀ /µg/g	
	Mäuse i.p.	Hennen i.p.	Hausfliegen topical	Rice stem borer Larven topical
(+) -EPN	17	12	1,1	2,9
(-) -EPN	16	47	3,2	11,7
Racemat	16	17	1,3	5,9
(⁺) -EPN				

Die Stereoisomeren des EPN zeigten gegenüber Mäusen dieselbe LD_{50} . Gegenüber Hennen besitzt das (-) -EPN eine wesentlich geringere Toxizität. Ebenso zeigt das (-) -EPN eine circa 4,0, bzw. das (+) -EPN eine circa 2,9 fache geringere Toxizität gegen Hausfliegen als gegen die Larven.

HODGE und Mitarbeiter (1954) führten mit EPN chronische Toxizitätstests bei Ratten über 2 Jahre durch. Als EPN-Dosis wendeten sie bei männlichen Ratten 0 (Kontrolle), 50, 150, 450 p.p.m.; bei weiblichen Ratten 0 (Kontrolle), 25, 75 und 225 p.p.m. an. Werte bis zu 150 p.p.m. bei männlichen Ratten bzw. bis 75 p.p.m. bei weiblichen Ratten hatten keinen Einfluß auf das Wachstum. Bei höheren EPN-Dosen blieb das Wachstum der Ratten hinter der Norm zurück.

Es gab aber selbst bei den höchsten Dosen keinen Einfluß auf die Lebensspanne im Sinne einer Verkürzung. Ebenso wurden keine hämatologischen Veränderungen gefunden; die im Urin gefundenen Zucker- und Eiweißwerte lagen innerhalb der Norm. EPN wurde nicht in den Organen und im Depotfett abgelagert. Schließlich wurden keinerlei histologische Veränderungen bei vollständiger Untersuchung der Ratten festgestellt.

Nach Landesverordnungen müssen in Deutschland Gifte, und somit auch Organophosphate in der Liste kennzeichnungsbedürftiger Stoffe aufgeführt werden. In den USA ist dies zentral geregelt (ULLMANN 1962). Diese Listen sind in unterschiedliche Gruppen unterteilt: einmal hochgiftig, dann giftig und schließlich weniger giftig. Je nach ihren unterschiedlichen LD₅₀ Werten werden die Organophosphate innerhalb dieser Liste aufgeteilt. EPN gehört der

Giftgruppe II an. In der nächsten Tabelle 4 werden einige Organophosphorsäuren aufgeführt und ihre Einordnung in die Giftstoffliste gezeigt.

Tabelle 4: Einteilung einiger Organophosphate nach der Giftstoffliste (nach U.S. Public Health Center Service)

Gruppe I sehr gefährlich	Gruppe II gefährlich	Gruppe III weniger gefährlich
Parathion	Delnav	Diazinon
Tepp	Methylparathion	Malathion
Paraoxon	EPN	Chlorthion
		Dicapthon

Ein Ausdruck für die etwaigen Gefahren beim dauernden Umgang mit Arbeitsstoffen sind die MAK-Werte (maximale Arbeitsplatzkonzentration), die bei täglich 8-stündiger Arbeit über Jahre ohne Schaden vertragen werden können.

Diese MAK-Werte sind hauptsächlich auf die mehr oder minder acute und subacute Toxizität einer Substanz begründet. Verschiedene MAK-Werte sind der folgenden Tabelle 5 zu entnehmen:

Tabelle 5: MAK-Werte einiger Organophosphorsäuren
 (nach DFG 1979)

<u>Organophosphorsäure</u>	<u>MAK-Wert</u>
TEPP (H)	0,05 mg/m ³
Phosdrin (H)	0,1 mg/m ³
E 605 (H)	0,1 mg/m ³
Systox (H)	0,1 mg/m ³
EPN (H)	0,5 mg/m ³
Malathion	15 mg/m ³

In der Liste der Deutschen Forschungsgemeinschaft (hier Kommission zur Prüfung gesundheitsschädlicher Arbeitsstoffe) wird durch ein hinzugefügtes (H) darauf aufmerksam gemacht, daß nicht nur die Inhalation höherer Konzentrationen, sondern auch die Hautresorption zu Vergiftungen führen kann.

3. Interaktionen des EPN mit anderen chemischen Mitteln

a) Synergismus EPN/Malathion und ähnliche Wirkungssteigerungen

Die Entwicklung immer neuer Organo-Phosphorsäureester und ihre Verarbeitung zu Kombinationswirkstoffen, aber auch die Anwendung von mehreren Organophosphaten in der Praxis ließ an die Möglichkeit von Interaktionen zwischen den Wirkstoffen denken, wie sie ja schon allgemein im Arzneimittelbereich bekannt geworden sind. Die toxi-

kologischen Probleme, die Gefahr für die Gesundheit der Arbeiter mußten genau abgeschätzt werden können, aber auch die Gefahr für den Verbraucher, der Organo-Phosphorsäure-ester anwendet oder damit behandelte Nahrungsmittel ißt. Deshalb wurden zunächst für die wichtigsten Organo-Phosphorsäureester Toleranzwerte (höchster Grenzwert für Rückstände in Lebensmitteln) eingeführt. Diese Werte wurden durch Beachtung der einzelnen Toxizitätseffekte bei akuten, subakuten und chronischen Tests festgelegt. Tabelle 6 gibt die Toleranzwerte einiger Organophosphorsäuren an.

Tabelle 6: Toleranzwerte einiger Organophosphorsäure-ester

	<u>ppm</u>
Parathion	1
Methylparathion	1
Systox	0,75
EPN	3
Malathion	8

FRAWLEY und Mitarbeiter (1957) griffen dann als erste auf, daß Potenzierungseffekte die Toxizität bei gleichzeitiger Gabe einer Kombination von Organo-Phosphorsäuren erhöhen können. Ihre Experimente gingen von der Überlegung aus, daß die Verbraucher mehrere Nahrungsmittel, die verschiedenen behandelt waren, ja zur gleichen Mahlzeit essen konnten, und auch Landarbeiter bei Kombinationsspritzungen mit zwei Mitteln in Berührung kommen konnten. FRAWLEY und

Mitarbeiter (1957) wählten zwei der damals gebräuchlichsten Mittel, nämlich EPN und Malathion, für ihre Versuche. Bei diesen Versuchen ging man nach DUBOIS (1961) von folgenden Vorstellungen aus:

Eine Potenzierung läßt sich am einfachsten beweisen, wenn man gleichzeitig äquivalente Mengen der LD_{50} von zwei zu testenden Organophosphorsäuren gibt. (Die LD_{50} -Dosen für die jeweiligen Mittel müssen vorher genauestens ermittelt werden). Ergibt sich jetzt eine höhere Sterblichkeit als 50 %, kann eine Potenzierung, nach PERKOW (1968) besser Synergismus, vorliegen. Bei einer Sterblichkeit von 50 % spricht man von additivem Effekt, bei weniger als 50 % von antagonistischem Effekt.

Wenn nach den Ergebnissen dieses einfachen Versuches eine potenzierende Wirkung vorliegen könnte, muß die Größe dieses Synergismus durch weitere Toxizitätstests festgesetzt werden.

Hierbei geht man von äquitoxischen Mischungen aus, d.h. man verwendet von den einzelnen Organophosphorsäuren Konzentrationen, die in Relation zur LD_{50} der betreffenden Organophosphorsäureester stehen.

Beträgt z.B. die LD_{50} des Mittels A 20 mg/kg und des Mittels B 80 mg/kg, wird in der Mischung 20 % von Mittel A und 80 % des Mittels B verwendet.

Der Grad der Potenzierung wird dann aus dem Vergleich der beobachteten LD_{50} zur erwarteten LD_{50} , die auf der Ebene strikten additiven Zusammenhangs angenommen wird, ermittelt. Dieser LD_{50} Wert läßt sich nach einer Methode von FINNEY (1952) aus der Gleichung

$$\begin{aligned} & \% \text{ Mittel A} / (LD_{50} \text{ von A} \times 100) + \\ & \% \text{ Mittel B} / (LD_{50} \text{ von B} \times 100) = 1/LD_{50} \text{ der Mischung} \end{aligned}$$

berechnen.

Diese Methoden verlangen aber, daß der Aktionsmechanismus der zwei Organophosphorsäureanteile gleich ist, und daß die Dosis-Mortalitäts-Kurven parallel sind. Man war überzeugt, daß die erste Forderung weitgehend erfüllt war, und zwar aufgrund der prinzipiellen gemeinsamen Cholinesterasehemmung, und daß zweitens die Dosis-Mortalitätskurven weitgehend parallel verlaufen.

1957 führten FRAWLEY und Mitarbeiter einen solchen Potenzierungstest durch. Sie verfütterten mit der Nahrung annähernd äquitoxische Dosen von Malathion und EPN im Verhältnis von 25 : 1. Als Versuchstiere verwendeten sie Ratten und Hunde. Vorher ermittelten sie die acute orale LD_{50} an Ratten und erhielten.

LD_{50} Malathion	1400 mg/kg
LD_{50} EPN	65 mg/kg

Die LD_{50} des Gemisches lag bei 167 mg/kg Malathion und

6 mg/kg EPN; bei reiner additiver Toxizität und Gabe jeweils der halben LD_{50} Menge läge der LD_{50} Wert der Mischung bei 700 mg/kg Malathion und 32,5 mg/kg EPN. Es zeigt sich also, daß eine Potenzierung vorlag. Das Gemisch zeigte eine circa 10-fache Wirkungssteigerung. Bei der Verfütterung des Gemisches an Hunde erreichte man sogar eine fast 50-fache Toxizitätssteigerung.

SUN und JOHNSON (1960) sprechen bei ähnlichen Versuchen von einem Cotoxicity Coefficient CTC (d.h. Konzentration eines Wirkstoffes, bei der 50 % der Versuchstiere sterben). Sie definierten den CTC als LC_{50} eines Wirkstoffes allein bezogen auf LC_{50} dieses Wirkstoffes im Gemisch. War jetzt der CTC-Wert höher als 1, bedeutete dies Synergismus, Werte unter 1 bewiesen Antagonismus. Sie untersuchten bei ihren Versuchen auch EPN und testeten es mit 1 % Anteil des Pyrethrum-Antagonisten Sesamex. Die Toxizität gegenüber Insekten wurde dadurch merklich herabgesetzt. SUN und JOHNSON (1960) erklärten die antagonistische Wirkung des Sesamex damit, daß Sesamex die biochemischen Oxidationsreaktionen hemmt, es also nicht zu einer Giftung des EPN komme.

TRIOLO und COON (1966) fanden eine antagonistische Wirkung zwischen chlorierten Kohlenwasserstoffen, Hier Aldrin, und Phosphorsäureestern z.B. EPN. Durch Gabe von 1 mg/kg Aldrin waren Mäuse über mehrere Tage geschützt. Die toxische Wirkung von EPN, das anschließend

gegeben wurde, war herabgesetzt. Zum Teil ließ sich diese protektive Wirkung damit erklären, daß Aldrin die Leber-A-Esterase und die Plasma-B-Esterase aktiviert (Detoxikationsprozesse). Wurden bei den Versuchen zuerst die Phosphorsäureester zugeführt und danach Aldrin, erreichte man eine potenzierende Wirkung.

1958 fanden COOK und Mitarbeiter in ähnlichen Versuchen einen synergistischen Effekt des EPN im Gemisch mit Malathion.

Um relevante auch auf kleinste subacute Dosen übertragbare Ergebnisse zu bekommen, schließen sich bei Mitteln, bei denen eine Potenzierung angenommen werden kann, subacute Tests an.

Hierbei werden wie die "Division of Pharmacology of the Food and Drug Administration" vorschlägt, über sechs Wochen subacute Dosen von zu testenden Organophosphorsäurepaaren an männliche und weibliche Hunde verfüttert. Den Hunden werden zu ihrem täglichen Futter maximal sichere Dosen (höchste Dosis einer Organophosphorsäure, die täglich eingenommen werden kann, ohne daß es zur Hemmung der Cholinesterase kommt) der zu testenden Organophosphorsäuren gegeben.

Vor Versuchsbeginn werden fünfmal während 2 Wochen die Plasmanormalwerte der Cholinesterase bestimmt. Im Versuch werden dann die Werte der Cholinesterasehemmung bei Kombination von Organophosphorsäuren gemessen. Diese werden

dann mit der Cholinesterasehemmung, die bei Gabe eines einzigen Mittels auftritt, verglichen. Hieraus läßt sich eine Potenzierung feststellen.

Wird unter diesen Versuchsbedingungen eine Hemmung der Cholinesterase über 40 % festgestellt, ist der Beweis für eine Potenzierung gegeben.

Diese subacuten Tests sind aber nur notwendig (DUBOIS 1961), wenn aufgrund der vorhergegangenen acuten Toxizitätstests eine Potenzierung angenommen werden kann. Dies gründet sich auf der Überlegung, daß die Toxizitätspotenzierung bei Gabe von Organophosphorsäuregemischen auf der Hemmung der Detoxikation des einen Gemischanteiles durch den anderen beruht.

Aufgrund dieser Überlegung ist es nach DUBOIS (1961) klar, daß, wenn eine Organophosphorsäure in großen Dosen in einem Gemische gegeben, keine Potenzierung bewirkt, dies auch nicht bei Gabe von subacuten Dosen geschieht.

Subacute Tests für die Kombination EPN und Malathion wurden erstmals 1957 von FRAWLEY und Mitarbeiter durchgeführt. Hierbei wurden an Hunde und Ratten mit dem täglichen Futter je nach Testreihe verschiedene subacute Dosen des EPN und des Malathions gegeben.

Wenn ein Futter, das 250 p.p.m. EPN enthielt, gegeben wurde, wurde eine 60 %ige Hemmung der Plasmacholinesterase und eine 93 %ige Aktivitätsverminderung der Erythrozytencholinesterase gemessen. Wenn 100 p.p.m. Malathion und

20 p.p.m. EPN (dies ist die maximal sichere Dosis des EPN und Malathion, die alleine gegeben, keine Hemmung der Cholinesterasen bewirken) dem täglichen Fressen beigemischt werden, erhielt FRAWLEY (1957) eine 68 %ige Hemmung der Erythrozytencholinesterase, die Aktivitätsminderung der Plasmacholinesterase war nicht signifikant.

Eine tägliche Verfütterung des Toleranzwertes 8 p.p.m. Malathion und 3 p.p.m. EPN während 8 Wochen bewirkte eine 24 %ige Hemmung der Erythrozytencholinesterase. Bei diesen Werten lag also keine Potenzierung vor.

Die gleichen Experimente mit Ratten zeigten, daß ein tägliches Futter, das 100 p.p.m. Malathion und 5 p.p.m. EPN enthielt, eine additive toxische Wirkung auslöste, dagegen 500 p.p.m. Malathion und 25 p.p.m. EPN eine 21 %ige Hemmung der Enzymaktivität.

DOULL und VAUGHN (nach DUBOIS 1961) wiederholten diese Versuche. Sie verwendeten ein Futter mit 100 p.p.m. Malathion-Anteil und 20 p.p.m. EPN-Anteil. Sie beobachteten dann bei Verfütterung an Hunde während eines 6-wöchigen Tests eine 56 %ige Hemmung der Plasmacholinesterase. Ihre Ergebnisse deckten sich im großen und ganzen mit den Ergebnissen, die FRAWLEY (1957) erzielte. Bei Versuchen mit Ratten beobachteten DOULL und VAUGHN (1961) einen größeren Effekt als FRAWLEY. Hier wurde eine 76 %ige Hemmung der Erythrozytencholinesterase und eine 56 %ige

Aktivitätshemmung der Plasmacholinesterase festgestellt. Aus diesen Ergebnissen ist klar ersichtlich, daß die Dosis des EPN für die Potenzierung ausschlaggebend ist (COOK und Mitarbeiter 1958, MURPHY und DUBOIS 1957).

Ist also genügend EPN im Futter vorhanden, das die Detoxikationsenzyme des Malathions ausreichend hemmt, so ist der Anstieg der Potenzierung, also die Hemmung der Cholinesteraseaktivität, abhängig von der Dosis des verfütterten Malathions.

Seitdem Tierexperimente zeigten, daß bei Gemischen von EPN und Malathion, selbst bei extrem niederen Dosen, die den Toleranzwerten, die als Rückstand auf behandelten Nahrungsmitteln noch erlaubt sind, nahekommen, schon eine Potenzierung der Toxizität eintritt, lag die Frage nahe, ob die festgelegten Toleranzwerte für Menschen auch absolut sicher seien.

MOELLER und RIDER führten deshalb 1960 einen Versuch durch. Sie gaben über 6 Wochen gesunden männlichen Testpersonen täglich die Toleranzwerte (3 mg EPN und 8 mg Malathion). Hierbei wurde keine Hemmung der Erythrozytencholinesterase und auch der Plasmacholinesterase beobachtet. Bei einer täglichen Dosis von 6 mg EPN und 12 mg Malathion wurde eine geringe Enzymhemmung festgestellt, die aber nicht als Potenzierung interpretiert werden konnte.

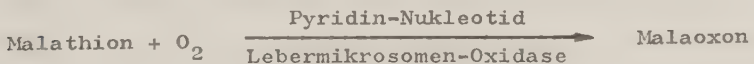
Durch diese Versuche wurde gezeigt, daß die Kombination EPN und Malathion für Menschen kein Gesundheitsrisiko darstellt und Gefahren, die durch die Potenzierung des Malathions durch das EPN entstehen, bei den zulässigen Toleranzwerten für EPN bzw. Malathion nicht gegeben sind.

b) Ursache der Wirkungssteigerung des Malathion durch EPN

Die akuten und subakuten Tests sind bei EPN und Malathion eine sichere Methode, eine mögliche gesundheitliche Gefahr aufgrund ihres Synergismus auszuschließen. Jedoch sollte der Wirkungsmechanismus des EPN, der zu einer Potenzierung der Toxizität des Malathions führt, bekannt sein, da anderenfalls eine vollständige Interpretation der gefundenen Toxizitätswerte unterbleiben muß.

Es gibt nach DUBOIS (1961) drei Möglichkeiten im Stoffwechsel des Malathions, bei denen die potenzierende Kraft des EPN eingreifen könnte:

1) Bei der Aktivierung des Malathions



2) Beim Wirkungsmechanismus des Malaoxon
Hemmung der Cholinesterase

3) Bei der Detoxikation
Hydrolyse des Malaoxon durch Aliesterase in
der Leber, im Serum und in anderen Geweben

Der erste Schritt im Metabolismus der Thiophosphorsäure-ester (z.B. Malathion, EPN) ist die Oxidation des Schwefelatoms. Das Schwefelatom wird durch ein Sauerstoffatom ersetzt. Diese Reaktion wird durch Pyridin-Nukleotid-abhängige Leberenzyme katalysiert.

Die Thiophosphate sind an und für sich nicht giftig, erst durch ihre Umwandlung in Sauerstoffanaloge werden sie zu hochtoxischen Anticholinesterasemitteln. Das unwirksame Malathion wird z.B. im Körper zu toxischem Malaoxon umgewandelt (gegiftet).

Wenn nun hier EPN mit seiner potenzierenden Wirkung eingreift, würde EPN die Umwandlung des Malathions in sein sauerstoffanaloges Malaoxon beschleunigen und somit eine Toxizitätssteigerung (Potenzierung) bewirken.

Mit einer 1957 entwickelten quantitativen Meßmethode zeigten MURPHY und DUBOIS, daß die Conversion Thiophosphat zum Sauerstoffanalogen im Falle EPN und Malathion nicht von EPN beeinflußt wird und auch nicht umgekehrt. Also kann eine Beschleunigung der Giftung nicht ursächlich für die Potenzierung der Toxizität des Malathions im Gemisch mit EPN stehen.

Die zweite Möglichkeit, nämlich daß das EPN im Wirkungsmechanismus des Malaoxon (Anticholinesterasemittel) direkt angreift und es durch die Präsenz des EPN zu einem Anticholinesteraseaktivitätsanstieg des Malaoxons kommt,

konnte ganz einfach durch die Tatsache ausgeschlossen werden, daß in vitro die Gabe von EPN-O und Malaoxon keine Toxizitätssteigerung ergab.

Es verblieb also nur noch die Möglichkeit, daß EPN in die Detoxifikation des Malathions eingreift. Hierfür erbrachten COOK und Mitarbeiter (1958) den Beweis. Malathion wird sehr schnell durch ein Leberenzym (Carboxylesterase) hydrolysiert und somit entgiftet.

EPN wirkt als Carboxylesterasehemmer (COOK und Mitarbeiter 1958, MURPHY und DUBOIS 1957, KNAAK und O'BRIEN 1960, DUBOIS 1961, DUBOIS und Mitarbeiter 1968) und somit als Synergist gegenüber Malathion. MURPHY und DUBOIS (1957) bewiesen diese Wirkung und entwickelten eine quantitative Methode, um den Hemmungseffekt des EPN auf den Abbau von Malathion zu messen.

Zuerst wurde in einem Testsystem die Hemmung der Cholinesterase in vitro durch Malaoxon gemessen. Anschließend wurde im gleichen Testsystem in verschiedenen Gewebepreparaten inkubiertes (z.B. Leber, Niere) Malaoxon verwendet. Es wurde auch hier die Cholinesterasehemmung gemessen. Aus dem Vergleich der beiden Meßwerte der Cholinesterasehemmung war es MURPHY und DUBOIS (1957) möglich, die Menge Malaoxon zu berechnen, das durch die Inkubation mit Gewebepreparat entgiftet, also zerstört wurde. Es zeigte sich, daß die Detoxikationsrate abhängig ist von der Konzentration des zugefügten Gewebepreparates. So entgifteten 2,5 und

5 mg Leberbrei 9,1 bzw. 20,1 μ g Malaoxon.

Die Entgiftungsrate erwies sich auch als linear abhängig von der Zeit. Der Beweis hierzu ergab sich aus der Detoxikation von 4,7; 8,9 und 13,7 μ g Malaoxon durch 2,5 mg Leberbrei in 5; 10 und 15 Minuten. Aus diesen Messungen konnte zuerst ein Überblick über die Aktivität des Detoxikationsenzymes (Carboxylesterase) in den verschiedenen Geweben und auch bei den getesteten Spezies gewonnen werden. Es war ersichtlich, daß die Carboxylase besonders in der Leber vorhanden ist und daß speziell die Hundeleber ein sehr hohes Detoxikationspotential hat. Dies stimmt mit der Beobachtung von FRAWLEY und Mitarbeiter (1957) überein, daß die Wirkungspotenzierung des Malathions durch EPN bei Hunden besonders hoch ist, sie beträgt ungefähr das 50-fache.

Jetzt wurde dem Enzymsystem, welches die Detoxikation des Malaoxon (bzw. Malathion) bewirkt, EPN in verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt und zwar 5 Minuten bevor Malaoxon hinzugemischt wurde. Es ergab sich jetzt eine signifikante Hemmung der Detoxikation, die Hemmung war proportional dem Logarithmus der EPN-Konzentration.

MURPHY und DUBOIS (1957) erreichten eine 50 %ige Hemmung der Detoxikation bei einer Konzentration von $2,8 \times 10^{-5}$ Mol EPN bei Leber von männlichen Ratten. Bei Leber von weiblichen Tieren, die kein so großes Detoxikationspo-

tential besitzen, wurde eine 50 %ige Hemmung bei der niedrigeren Dosis von 5×10^{-6} Mol EPN erreicht.

MURPHY und DUBOIS (1957) führten diese Versuche auch an lebenden Ratten (in vivo) durch. Sie gaben einer Gruppe von Ratten verschiedene Dosen EPN (0,5 mg/kg, 1 mg/kg oder 1,5 mg/kg) intraperitoneal. Nach einer Stunde stellten sie aus der Leber der behandelten Ratten einen Gewebebrei her und maßen die durch die behandelte Leber verursachte Hemmung der Detoxikation des Malaoxons. Hier trat erwartungsgemäß ebenfalls eine Hemmung auf, die Ergebnisse der in vitro Versuche konnten also auf in vivo Versuche übertragen werden.

Die Ergebnisse sind der folgenden Abb. 2 zu entnehmen.

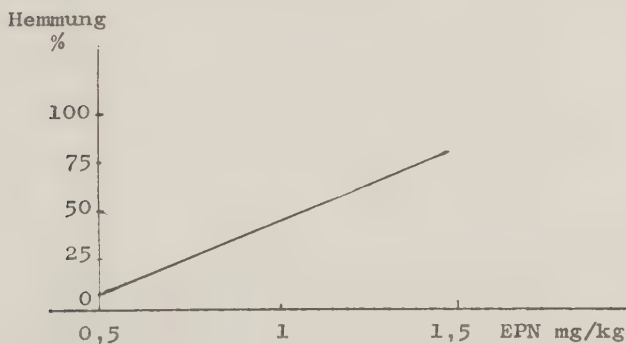


Abb. 2 Hemmwirkung des EPN in vivo auf die Fähigkeit von Rattenleber, Malaoxon zu entgiften. Es wurde Leber von Ratten entnommen, die 1 Stunde vor dem Versuch intraperitoneal EPN gespritzt bekamen (MURPHY und DUBOIS 1957)

Ebenso wurde von den obengenannten Autoren die Zeitabhängigkeit der Hemmwirkung des EPN gemessen. Sie gaben Ratten 1,5 mg/kg EPN intraperitoneal; bei dieser Konzentration besteht nach einer Stunde eine 84 %ige Hemmung des Detoxikationspotentials des Leberbreis. Jetzt wurden in verschiedenen zeitlichen Abständen nach intraperitonealer Gabe von EPN aus der Rattengruppe Tiere entnommen und ein Leberbrei hergestellt. Der Versuch erstreckte sich über 72 Stunden. Das Detoxikationspotential der untersuchten Leber regenerierte sich während dieser 72 Stunden. Der Zeitpunkt der Verabreichung des EPN ist also von enormer Wichtigkeit. Je länger der Zeitpunkt zwischen der Gabe von EPN und der von Malathion ist, desto geringer ist die potenzierende Wirkung des EPN auf die Toxizität des Malathions. Diese Zeitabhängigkeit ist deutlich in der nachfolgenden Abb. 3 zu sehen.

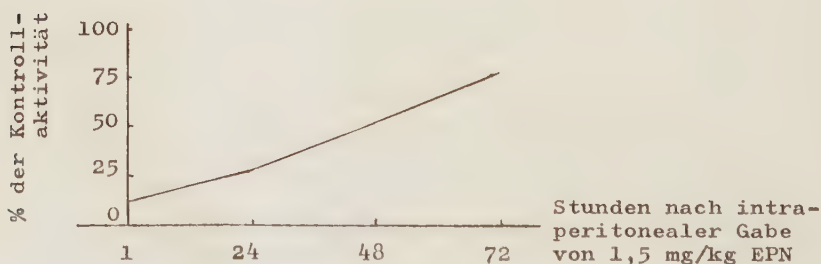


Abb. 3 Dauer der Hemmwirkung einer einzigen intraperitoneal gegebenen EPN-Dosis (1,5 mg/kg) auf die Fähigkeit von Rattenleber, Malaoxon zu entgiften (MURPHY und DUBOIS 1957)

MURPHY und DUBOIS (1957) führten diesen Versuch auch mit subacuten Dosen durch. Sie verfütterten während 2 Wochen verschiedene EPN-Dosen im Bereich von 5 p.p.m. bis 100 p.p.m. Anschließend wurde wiederum die Hemmung des Detoxikationspotentials der Leber gegenüber Malaoxon gemessen. Selbst so niedere Werte wie 5 p.p.m. EPN bewirkten eine Hemmung des Detoxikationspotentials. Eine Übersicht der Hemmwirkung bei subacuten EPN-Dosen auf Malaoxon ist der folgenden Tabelle 7 zu entnehmen.

Tabelle 7: Wirkung von verfüttertem EPN auf die Fähigkeit von Rattenleber, Malaoxon zu entgiften (MURPHY und DUBOIS 1957)

tgl.Dosis von EPN p.p.m.	entgiftetes Malaoxon/mg Leber während 10 Minuten, in μ g			Hemmung %
Kontrollen	5,6	$\pm$	0,72	
5	4,0	$\pm$	0,15	28,6
10	2,4	$\pm$	0,5	57,1
20	1,2	$\pm$	0,15	78,6
50	0,62	$\pm$	0,09	87,9
100	0,28	$\pm$	0,13	95,0

ROSENBERG und COON (1958) unternahmen ähnliche Versuche und auch sie erhielten signifikante Beweise, daß die Potenzierung des Malathions durch das EPN auf der Hemmung der Entgiftung des Malaoxons beruht.

In der Folgezeit wurde das Gemisch EPN und Malathion wiederholt untersucht. Auch bei diesen Versuchen zeigte EPN eine synergistische Wirkung.

KREITZER und SPANN (1973) fanden bei Fasanen und Wachteln eine circa 3-fache Toxizitätspotenzierung des Malathions durch EPN.

MACEK (1975) beobachtete bei Fischen (*Lepomis macrochirois*) eine potenzierende Wirkung (2-fache Toxizitätssteigerung) des EPN im Gemisch mit Malathion.

4. Verzögerte neurotoxische Wirkung des EPN

Noch bevor etwas über die Anticholinesteraseaktivität der Phosphorsäureester bekannt war, wurde über neurotoxische Folgen bei Gabe von Organophosphaten berichtet. TOCP (Triorthocresylphosphat) ist ein Organophosphat, das erstmal 1899 wegen seiner Neurotoxizität erwähnt wurde (LOROT 1899). Es wurde damals über schlaffe Lähmungen der Arme und Beine nach Gabe von TOCP berichtet.

Durch TOCP ausgelöste Vergiftungen ereigneten sich auch in der Folgezeit. 1930 trat in Amerika eine Massenvergiftung nach Genuß von mit TOCP verfälschtem Jamaika-Rum auf (Ginger Paralysis; SMITH, ELVOVE und FRAZIER 1930). 1959 ereignete sich in Marokko wiederum eine durch TOCP ausgelöste Massenvergiftung (TOCP wurde damals als Speiseöl verwendet) (SMITH und SPALDING 1959).

Die Symptome traten bei beiden Vergiftungen erst verzögert ein (10 - 14 Tage), es handelte sich um schwere Lähmungen an den Beinen und Händen.

Die ersten Berichte über eine verzögerte neurotoxische Wirkung des EPN stammen von DURHAM und Mitarbeiter (1956). 1956 berichteten auch FRAWLEY und Mitarbeiter über Degeneration der Myelinschicht nach Gabe von subacuten Dosen von EPN an Hühner. Diese Wirkung wurde aber nur an einzelnen Tieren einer Versuchsgruppe beobachtet. Eine Korrelation zwischen Dosis und verzögerter neurotoxischer Wirkung konnte nicht ermittelt werden. Dies ist nach Ansicht von FRAWLEY (1976) darauf zurückzuführen, daß bei Gabe von EPN zusammen mit dem Futter nicht sichergestellt werden konnte, daß die Versuchstiere immer die gleiche Menge von EPN bekamen.

In der Folgezeit beobachteten WITTER und GAINES (1963) und GAINES (1969) verzögerte Neurotoxizität nach Gabe von EPN bei Hühnern.

WITTER und GAINES (1963) fanden keine Korrelation zwischen den neurotoxischen Syndromen und der Hemmung der Cholinesterase.

1978 testeten ABOU-DONIA und GRAHAM technisches EPN (85 %) an Hühnern. Sie gaben über 90 Tage subchronische EPN-Dosen. Es wurden jeweils an Gruppen von 6 Hühnern in Gelatine-Kapseln 0,01; 0,1; 0,5; 1,0; 2,5; 5,0 und 10,0 mg/kg EPN

oral gegeben. Ab 2,5 mg/kg EPN bis 10 mg/kg EPN wurde den Hühnern gleichzeitig mit dem Organophosphat über 34 Tage Atropinsulfat gegeben. Dies sollte vor der akuten Giftwirkung des EPN schützen. Dadurch erhielten die Versuchstiere auch einen ausreichenden Schutz. Nachdem nach 34 Tagen die Atropinbehandlung abgebrochen wurde, zeigten die Hühner dennoch keine cholinergen Zeichen.

ABOU-DONIA und GRAHAM (1978) meinen deshalb, daß die gleichzeitige Gabe von Atropinsulfat und EPN über 34 Tage bei den Hühnern einen Adaptionsmechanismus auslöste, der sie vor der akuten Vergiftung mit EPN schützte. Es lag aber keine Schutzwirkung des Atropinsulfates gegen die verzögerte Neurotoxizität vor (DURHAM und Mitarbeiter 1956, ABOU-DONIA und GRAHAM 1978). Bei Gabe von 0,01 mg/kg EPN (85 %) täglich trat keine verzögerte neurotoxische Wirkung auf; bei so kleinen Dosen wie 0,1 mg/kg EPN und 1,0 mg/kg EPN traten aber schon neurotoxische Wirkungen auf. Bei Dosen von 0,5 bis 10 mg/kg EPN täglich schritten die neurotoxischen Symptome auch nach Absetzen des EPN (nach 90 Tagen) während der nun folgenden 30-tägigen Beobachtungszeit fort.

Bei den Hühnern, die 0,1 mg/kg EPN erhielten, zeigte sich eine Rückentwicklung der klinischen Symptome während der Beobachtungszeit.

Die beobachteten klinischen neurotoxischen Zeichen waren im großen und ganzen dosisabhängig. Sie reichten von leichter Ataxie bis zur vollständigen Lähmung.

Eine Übersicht über die gefundenen neurotoxischen Symptome gibt die folgende Tabelle 8.

Tabelle 8:

Klinisches Bild der verzögerten neurotoxischen Wirkung bei
Hühnern nach Gabe von EPN, Einteilung nach dem Schweregrad
(ABOU-DONIA und GRAHAM 1978)

leichte Ataxie (mild ataxia T ₁)	mittlere Ataxie (gross ataxia T ₂)	schwere Ataxie (severe ataxia T ₃)	schwerste Ataxie (ataxia with near paralysis T ₄)	Lähmung (paralysis)
Verminderte Bein- bewegungen, Widerwillen zu gehen Tendenz auf dem Boden auszuglei- ten oder hinzu- fallen	Störungen bei Kontrolle der Beinmuskulatur mit Änderung der Gangart	Die Hühner strek- ken ihre Beine nach vorne aus u. können sie nicht mehr strecken oder absinken lassen	Schwierigkeiten beim Bewegen der Beine, können nicht mehr gehen, während der mei- sten Zeit sitzen sie in der Hocke	Sie können auf ihren Beinen nicht mehr stehen, Atmungs- und Schluck- beschwerden, Sie zeigen ein unregel- mäßig schnel- les Zittern des Kopfes

Bei der Untersuchung der Abhängigkeit zwischen zeitlichem Auftreten der verzögerten Neurotoxizität und der täglichen EPN-Dosis wurde von ABOU DONIA und GRAHAM (1978) eine umgekehrte Abhängigkeit beobachtet. Neurotoxische Symptome bei EPN-Dosen zwischen 0,1 mg/kg und 10 mg/kg zeigten sich 5 bis 21 Tage nach Versuchsbeginn (siehe Abb. 4).

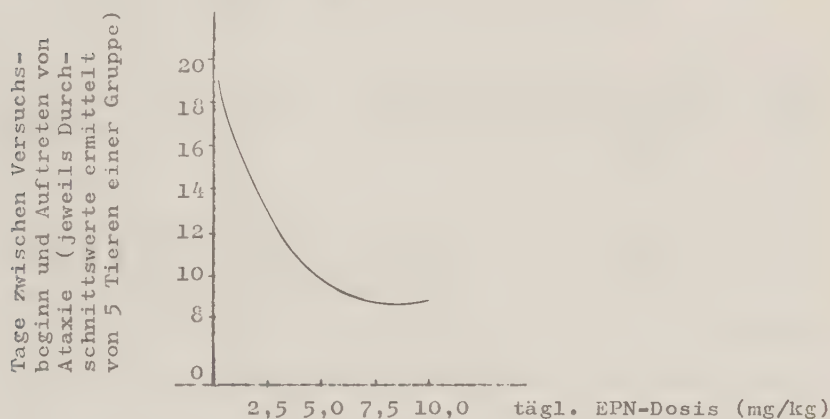


Abb. 4 Wirkung von verschiedenen täglichen oralen EPN-Dosen auf den Zeitraum, der vergeht, bis Hennen neurotoxische Zeichen entwickeln (ABOU DONIA und GRAHAM 1978)

Es zeigte sich auch, daß die Gesamtdosis, die bis zum Zeitpunkt, an dem neurotoxische Zeichen auftreten, gegeben wurde, unterschiedlich war und von der täglichen EPN-Dosis abhängt (ABOU DONIA und GRAHAM 1978). Je niedriger die Einzeldosis, desto niedriger war auch die Gesamtdosis. Dies ist in der folgenden Abbildung 5 graphisch dargestellt.

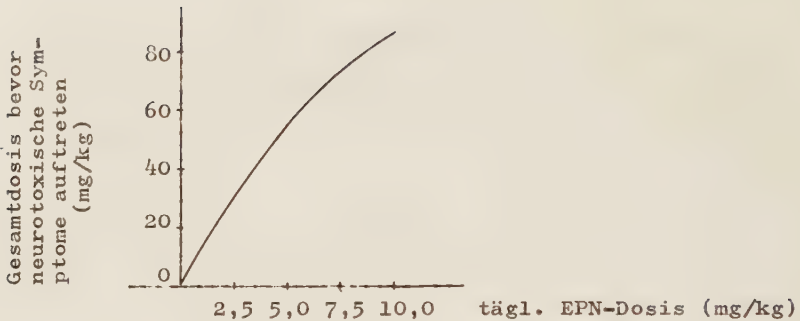


Abb. 5 Beziehung zwischen täglicher Dosis von technischem EPN (85 %) und Gesamtdosis, die gegeben wurde, bis sich Ataxie bei Hühnern entwickelt (ABOU DONIA und GRAHAM 1978)

Als pathologisches Substrat dieser klinischen Zeichen fand man eine Degeneration des Axons und der Myelinscheiden am peripheren Nerv und Degenerationserscheinungen an den Bahnen des Rückenmarks (DURHAM und Mitarbeiter 1956, FRAWLEY und Mitarbeiter 1956, ANONYMUS 1968, OHKAWA und Mitarbeiter 1977, ABOU DONIA und GRAHAM 1978). Diese Degenerationserscheinungen sind nach ABOU DONIA und GRAHAM (1978) dosisabhängig. Bei großen täglichen Dosen werden schwere histopathologische Veränderungen gefunden, bei kleinen Dosen nur minimale bis gar keine. Es ließ sich kein Zusammenhang zwischen der Schwere der histopathologischen Veränderung und der Dauer der neurotoxischen Symptome (Auftreten der Ataxie bis zum Tod bzw. Tötung des Versuchstieres) feststellen (ABOU DONIA und GRAHAM 1978).

Allein die Dosis des EPN ist für die Schwere der histopathologischen Veränderung verantwortlich, selbst kleinste Dosen, die keine Hemmung der Cholinesterase bewirken, können akkumulieren und einen neurotoxischen Effekt auslösen und histopathologische Veränderungen setzen (ANONYMUS 1968, ABOU-DONIA und GRAHAM 1978). Diese Gefahr ist auch für Menschen gegeben.

PETTY (1958) berichtet von einem Vergiftungsfall beim Menschen. Ein Mann, der öfters mit EPN arbeitete, erlitt eine dauernde Nervenschädigung und war in der Folgezeit immer krank, leicht reizbar, außerdem verlor er an Gewicht (auf diesen Fall wird später im Kapitel Vergiftung mit EPN noch eingehend eingegangen).

Neben der akuten toxischen Wirkung auf Hennen untersuchten OHKAWA und Mitarbeiter (1977) die verzögerte neurotoxische Wirkung der Stereoisomere des EPN.

Hierbei zeigte sich, daß (-) -EPN eine geringere acute Toxizität als (+) -EPN, jedoch neurotoxische Wirkung besitzt.

((-) -EPN LD_{50} gegen Hennen = 47 mg/kg, (+) -EPN LD_{50} gegen Hennen = 12 mg/kg)

(+) -EPN wirkt dagegen akut stark toxisch (im Vergleich mit (-) -EPN), zeigt aber selbst bei großen Dosen wie 89,2 mg/kg keine verzögerte neurotoxische Wirkung. Das Racemat von EPN zeigte wiederum neurotoxische Wirkung.

Bei allen behandelten Hennen entwickelten sich sofort nach Gabe der EPN-Stereoisomere und des Racemats cholinerge Vergiftungserscheinungen. Diese entwickelten sich aber innerhalb einer Woche zurück und waren nicht mehr sichtbar. Danach entwickelte sich dann etwa zwischen dem 10. bis 14. Tag nach Versuchsbeginn bei den mit Racemat und (-) -EPN behandelten Hennen irreversible Lähmungen an den Beinen. Die kleinste Dosis, die verzögert neurotoxische Symptome bei den Hennen bewirkte, war 40,6 mg/kg (-) -EPN, beim Racemat betrug sie 52,8 mg/kg. (+) -EPN war nicht neurotoxisch. Ebenso wurden keine histopathologischen Veränderungen an den Nervenbahnen der mit (+) -EPN behandelten Hennen gefunden; im Gegensatz zu mit (-) -EPN oder Racemat behandelten Hennen (OHKAWA und Mitarbeiter 1977).

OHKAWA und Mitarbeiter (1977) halten das (+) -EPN für ein geeigneteres Insektizid als das Racemat, da (+) -EPN eine hohe Toxizität gegen Schädlinge besitzt (LD_{50} gegen Hausfliege = 1,1 µg/g), im Gegensatz zum Racemat aber keine neurotoxische Wirkung zeigt.

Aus der folgenden Tabelle 9 sind die Versuchsergebnisse der Neurotoxizitätsprüfung der optischen Isomeren des EPN zu ersehen.

Tabelle 9: Die verzögerte neurotoxische Wirkung von Racemat, (+) und (-) -EPN auf Hennen (mit Atropinsulfat gegen die acute Toxizität des EPN geschützt) OHKAWA und Mitarbeiter 1977

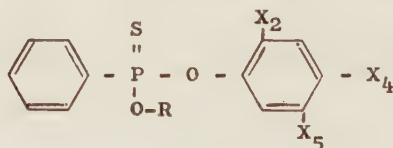
Dosis mg/kg	(+) -EPN		(-) -EPN		Racemat(±) -EPN	
	behandelte Hennen	ge- storben	behandelte Hennen	ge- storben	behandelte Hennen	ge- storben
	Anzahl	verzögerte Lähmungs- erscheinung	Anzahl	verzögerte Lähmungs- erscheinung	Anzahl	verzögerte Lähmungs- erscheinung
31,2	3	0	3 ^{a)}	0	5	0
40,6	3	0	3 ^{a)}	1	5	0
52,8	3	0	3 ^{a)}	2	5	1
68,6	3	0	3	0	3	0
89,2	3	2	3	0	3	1

a) nicht mit Atropinsulfat geschützt

ABOU-DONIA und Mitarbeiter (1978) berichten aber, daß auch (+) -EPN eine verzögerte neurotoxische Wirkung zeigt. Im Gegensatz zu (-) -EPN und zum Racemat ist die Schwere der klinischen Symptomatik bei gleichen Versuchsbedingungen aber geringer. Die histopathologischen Veränderungen korrelierten mit der Schwere der klinischen Symptome.

ABOU-DONIA (1979) testete die Wirkung von fünf Phenylphosphonsäureester bei Hennen, nämlich Cyanofenphos, Leptophos, Desbromoleptophos, EPN und EFBP. Ihre Strukturformeln sind in der nachstehenden Tabelle 10 aufgeführt.

Tabelle 10: Strukturformeln von Leptophos, DBL, EFBP, EPN und Cyanofenphos (ABOU-DONIA 1979)



Phosphorsäureester	R	X ₂	X ₄	X ₅
Leptophos	CH ₃	Cl	Br	Cl
DBL	CH ₃	Cl	H	Cl
EFBP	C ₂ H ₅	Cl	Cl	H
EPN	C ₂ H ₅	H	NO ₂	H
Cyanofenphos	C ₂ H ₅	H	CN	H

Alle diese Organophosphorsäuren zeigten verzögerte neurotoxische Wirkung.

EPN besitzt von den 5 getesteten Phosphonsäureester die höchste acute Toxizität ($LD_{50} = 10 \text{ mg/kg}$ gegen Hennen) aber gegen Cyanofenphos (acute Toxizität $LD_{50} = 540 \text{ mg/kg}$ bei Hennen) eine 2,5-fach verringerte Potenz, verzögerte Neurotoxizität auszulösen. EPN stand hinter Cyanofenphos an zweiter Stelle. Die von ABOU-DONIA (1979) gefundenen minimalen neurotoxischen Dosen und die relative Neurotoxizität dieser 5 Organophosphorsäuren sind der Tabelle 11 zu entnehmen.

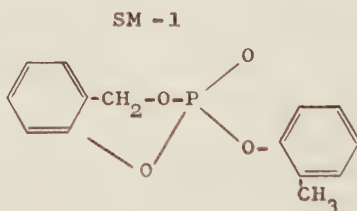
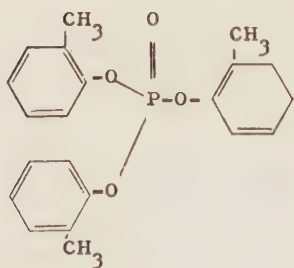
Tabelle 11: Minimale neurotoxische Dosis und relative Neurotoxizität von 5 Organophosphaten (ABOU-DONIA 1979)

Organophosphon- säureester	Minimale neurotoxische Dosis mg/kg	Relative Neurotoxizität
Cyanofenphos	10	80
EPN	25	32
Desbromoleptophos	50	16
Leptophos	100	8
EFBP	800	1

Die Diskrepanz bei EPN zwischen höchster acuter Toxizität und zweithöchster neurotoxischer Wirkung bestätigt auch die Schlußfolgerung, daß die verzögerte neurotoxische Wirkung in keinem Zusammenhang mit der Anticholinesterase-Wirkung steht (ABOU-DONIA 1979). Aus diesem Versuchsergebnis zieht ABOU-DONIA den Schluß, daß die verzögerte Neuro-

toxizität ein gemeinsames Charakteristikum der Phenylphosphonsäureester sein könnte. Eine exakte Aussage aufgrund der Struktur eines Phenylphosphonsäureesters, ob dieser nun verzögert neurotoxisch wirkt oder nicht, läßt sich aber nicht machen (ALDRIDGE und BARNES 1967). Denn die neurotoxische Wirkung dürfte nicht von der ursprünglichen Substanz ausgehen (ALDRIDGE und BARNES 1967), sondern von Metaboliten. Es dürfte also genau wie bei der cholinergen Wirkung eine Giftung vorausgehen. Für die TOCP ist dies bewiesen. TOCP wirkt nicht direkt, sondern über seinen Metaboliten SM-1, dessen Struktur ermittelt wurde (ETO, CASIDO und ETO 1962, CAVANAGH 1973):

TOCP



Die minimale Einzeldosis, die verzögerte Neurotoxizität auslöst, ist bei TOCP: 500 mg/kg, bei SM-1: 1 mg/kg (CASIDA und Mitarbeiter 1961).

Der Angriffspunkt der neurotoxischen Wirkung scheint aber gesichert zu sein. Der Primärangriff des EPN und auch der anderen Phosphorsäureester erfolgt am Neuron selbst (ALDRIDGE und BARNES 1967, JOHNSON 1974). Die Schäden an

der Myelinschicht und den Schwann'schen Zellen sind sekundär. CAVANAGH (1954) spricht hier von "dying back".

Die an den Neuronen bewirkten Primärschäden führen nicht sofort zu einer Zerstörung des Neurons. Es ist nur nicht mehr fähig, das äußerste (distale) Ende des Axons voll funktionsfähig zu erhalten. Dies führt zu einem Absterben des Axons vom distalen Ende her zur Nervenzelle.

Der auslösende Mechanismus kann nach ALDRIDGE und BARNES (1967), EL SEBAE und Mitarbeiter (1977) nicht mit der Anticholinesterasewirkung der Organophosphorsäureester zusammenhängen, da die neurotoxischen Symptome erst verzögert nach 7 bis 29 Tagen auftreten. Zu dieser Zeit ist eine cholinerge Giftwirkung meist nicht mehr bemerkbar und die Blockierung der Cholinesterase kann aufgehoben sein. Auch stehen die paralytischen Syndrome von EPN und anderen neurotoxischen Organophosphaten in keiner Korrelation zur Hemmwirkung auf Hirn oder Plasmacholinesterase (WITTER und GAINES 1963), POULSON und ALDRIDGE (1964) glaubten, daß eine neurotoxische Organophosphorsäure direkt am Neuron bestimmte Esterasen hemmt, die im Stoffwechsel des Neurons eine wichtige Rolle spielen.

Nach JOHNSON (1975) gibt es im Hirn und im Rückenmark bei Tieren, bei denen nach Gabe von EPN oder anderen neurotoxischen Phosphorsäureestern verzögert neurotoxische Symptome eintreten, ein spezifisches Protein, eine so ge-

nannte "Neurotoxic Esterase". Dies bedeutet aber nicht gemäß der wörtlichen Übersetzung - "Neurotoxische Esterase" -, daß dieses Protein selbst verzögerte Neurotoxizität auslöst, vielmehr muß sie erst durch einen neurotoxischen Phosphorsäureester gehemmt werden (JOHNSON 1975, EL SEBAE und Mitarbeiter 1977). Nach Ansicht der vorher genannten Autoren ist die in vitro-Hemmung der neurotoxischen Esterase ein präzises Mittel um zu prüfen, ob ein Organophosphorsäureester verzögert neurotoxisch wirkt.

Bei in vitro-Versuchen von EL SEBAE und Mitarbeiter (1977) konnte dies auch für EPN bestätigt werden (siehe Tabelle 12).

Tabelle 12: Versuchsergebnisse. In vitro-Hemmung der Hirnenzyme (von Mäusen) durch verschiedene Phosphorsäureester (EL SEBAE und Mitarb. 1977)

Organophosphorsäure	PJ ₅₀	PJ ₅₀	PJ ₅₀
	In vitro Hemmung der Hirnenzyme		
	Acetylcholinesterase	Neurotoxische Esterase	Monoaminoxidase
Leptophos	4,658	6,895	6,12
EPN	5,520	5,347	4,10
Chlorpyrifos	5,602	NS x)	4,00
Phosfolan	5,420	NS x)	4,00
Stiropfos	4,602	NS x)	4,00

x) NS = nicht signifikant

5. Teratogenität des EPN

KHERA und Mitarbeiter (1966) bewiesen den teratogenen Effekt des EPN bei Enten. Die Enten wurden während der Embryonalphase am 13. Tag durch den Dottersack mit 100 μ g EPN geimpft. Sie zeigten nach dem Ausschlüpfen deutlich Lethargie und Asthenie. 27 % zeigten am Metatarsophalangealgelenk, ebenso auch am ersten und zweiten Phalangealgelenk bleibende³ Mißbildungen. Bei Impfung mit 10 μ g EPN traten keine bleibenden Mißbildungen auf. Lethargie und Asthenie waren ähnlich, jedoch vorübergehend. Bei diesen Versuchen lag die Bruttemperatur im Optimalbereich. Erhöhte man die Temperatur, zeigten die Jungenten bei 10 μ g EPN schwerere Mißbildungen als die entsprechende 10 μ g-Gruppe, die unter optimalen Bedingungen ausgebrütet wurde.

6. Anwendung des EPN

Die Anwendung von EPN entspricht in etwa der von Parathion. Es gelangt als Spritzpulver, als emulgiertes Konzentrat und als Staub in den Handel.

Mit EPN werden bestimmte Milben, z.B. rote Zitrusmilbe und Insekten im Obstanbau vernichtet. Es wird aber auch im Feld- und Gemüsebau verwendet. Vom Hersteller Du Pont werden 0,84 - 13,45 kg von activer EPN-Substanz pro Hektar empfohlen. Nach der Anwendung von EPN muß eine festgelegte Wartezeit bis zur Ernte eingehalten werden, sie liegt zwischen 3 und 30 Tagen. Die Länge der Wartezeit richtet sich

innerhalb dieser Grenzen nach dem verwendeten EPN in kg/Hektar.

Diese Wartezeit ist notwendig, um die Konzentrationen der EPN-Rückstände zu reduzieren, so daß beim Ernten und auch beim Verzehr der behandelten Lebensmittel keine Gefahr entsteht. Wenn man die Rückstände des EPN nach der letzten Anwendung bis zu ihrem Verschwinden oder bis zur Ernte des behandelten Gutes verfolgt und sie gegen die Zeit aufträgt, erhält man Abbaukurven. Da der Abbau des EPN fast wie nach einer Reaktion erster Ordnung verläuft, liefert diese Darstellung eine Gerade, wenn man die Logarithmen der Rückstände einsetzt. Man spricht deshalb von Rückstandshalbwertszeiten (FREHSE 1970) oder von "half-life"-Zeiten (RL_{50} Zeit).

Aus verschiedenen Abbaureihen von EPN an einer Pflanze lassen sich dann Grenzkurven erstellen. Aus diesen läßt sich die für die Praxis erforderliche Wartezeit ermitteln. Die Halbwertszeiten von EPN werden unterschiedlich angegeben. FAHEY und Mitarbeiter (1952) beobachteten eine Halbwertszeit des EPN auf Blättern von Apfelbäumen von 3- 5 Tagen, bei Blättern von Pfirsichbäumen lag die RL_{50} Zeit bei 5 Tagen (BRUNSON und KOBLITSKY 1952). Bei Zitronen berichtet GUNTHER (1969) von einer Halbwertszeit von circa 80 Tagen (nach Carmann 1955). Bei Orangen beträgt die Halbwertszeit circa 50 Tage (GUNTHER 1969).

Diese unterschiedlichen Abbaukurven lassen sich darauf zurückführen, daß die Abbaurate einer Organophosphorsäure von vielen Parametern abhängig ist:

- 1) Größenzunahme der Früchte
(Verdünnungseffekt: FREHSE 1970)
- 2) Typ der Frucht
(BRUNSON und KOBLITSKY 1952, FAHEY und Mitarb. 1952)
- 3) Oxidation
(Erhöhung der Wasserlöslichkeit: COFFIN 1964)
- 4) Klimaeinflüsse
(Temperatur, Regen, Wind etc., FREHSE 1970, COFFIN 1964)
- 5) Flüchtigkeit der Organophosphorsäure
(FREHSE 1970)
- 6) Hydrolyse
(FREHSE 1970, COFFIN 1964)

Aus Vergleichsuntersuchungen zeigte sich, daß Parathion-Methylparathionrückstände schneller verschwinden als EPN. EPN hat also eine größere Persistenz (TASCHENBERG und AVENS 1960, BRUNSON und KOBLITSKY 1952, FAHEY und Mitarbeiter 1952). Bei wiederholter Anwendung des EPN kann nach SMITH und Mitarbeiter (1952) ein kumulativer Effekt bei den Rückständen erreicht werden. Diese Gefahr ist bei einem Mittel von höherer Persistenz, z.B. EPN, größer als bei einem Mittel niedriger Persistenz, z.B. Methyl-Parathion, Parathion und Malathion.

Die von verschiedenen Autoren erhaltenen Halbwertszeiten des EPN werden in der nächsten Tabelle 13 im Vergleich zu Parathion dargestellt.

Tabelle 13: Halbwertszeiten des EPN im Vergleich mit Parathion

Insektizid	Substrat	Halbwertszeiten in Tagen	berichtet bei
EPN	Blätter von Apfelbäumen	4, 3, 5,	Fahey und Mitarb. 1952
	Pfirsich	10, 9, 8, 9,	Fahey und Mitarb. 1952
			Brunson und Koblitsky 1952
	Blätter vom Pfirsichbaum	5, 5,	Brunson und Koblitsky 1952
Parathion	Blätter vom Apfelbaum	1, 3, 2, 2,	Fahey und Mitarb. 1952
	Pfirsich	3, 7, 4, 4,	Brunson und Koblitsky 1952
			Fahey und Mitarb. 1952
	Blätter vom Pfirsichbaum	3, 7, 3,	Fahey und Mitarb. 1952
			Brunson und Koblitsky 1952
			Decker u. Mitarb. 1950

Aus den Abbaukurven läßt sich auch kalkulieren, ob nach einer gewissen Zeit noch genügend Wirkstoff des EPN vorhanden ist, um einen Pflanzenschädling wirksam bekämpfen zu können (JEPPSON und GUNTHER 1970). Es läßt sich die optimale (am wenigsten insektizid-aufwendige) Methode zur Insektenbekämpfung errechnen. Die LC_{50} EPN-Dosis für den betreffenden Pflanzenschädling muß gegeben sein.

JEPPSON und GUNTHER (1970) zeigten in Californien bei einer Feldstudie zur Bekämpfung der roten Zitrus-Milbe (LC_{50} EPN

1 p.p.m.), daß sowohl bei einer Ausgangskonzentration von 0,5 l.b EPN/100 Gallonen (0,2268 kg/454 l) als auch bei 0,25 l.b EPN/100 Gallonen (0,1134 kg/454 l)

der Wert der Rückstände bei beiden Dosierungen nach 43 Tagen 0,95 p.p.m. betrug. Für circa 43 Tage nach Anwendung des EPN waren für beide Dosen also wirksame Rückstandswerte zur Bekämpfung der roten Zitrus-Milbe gegeben. Die 0,25 l.b Dosis (0,1134 kg/454 l) war effektiver.

Für die Beurteilung der Rückstände des EPN ist auch die Verteilung innerhalb der Pflanze wichtig. Nach COFFIN (1964) und GUNTHER (1969) sind die Rückstände des EPN fast vollständig Oberflächenrückstände (siehe Tabelle 14).

Tabelle 14: Verteilung der EPN-Rückstände 30 Tage nach Anwendung von EPN bei Orangen (GUNTHER 1969)

Insektizid	Substrat	Maximaler Rückstandswert p.p.m.	
		Schale	Saft
EPN	Orangen	3,1	< 0,1

7. Wirkungsmechanismus von EPN

a) Die anticholinerge Wirkung des EPN

Die acute toxische Wirkung des EPN wird durch einen Angriff auf die normale Reizleitung bewirkt (sowohl beim Säugetier als auch bei Insekten). Hieraus entstehen Störungen an den betroffenen Erfolgsorganen. Der Grundbaustein des Nervensystems ist das Neuron. Es ist als funktionelle Einheit zu sehen. Die Nervenzelle ist eine mit einem Kern versehene Zelle. Von ihr führen zahlreiche Fasern - Dendriten - weg. Von diesen ist eine, (Neurit) die längste Faser, für die Ableitung des Reizes vom Zellkörper weg zu anderen Neuronen oder zum Erfolgsorgan (Effektor) verantwortlich. Die funktionelle Verknüpfung der einzelnen Neurone oder des Neurons mit dem Erfolgsorgan erfolgt über Synapsen.

Das Nervensystem läßt sich nach O'BRIEN (1967) wie in Abb. 6 darstellen.

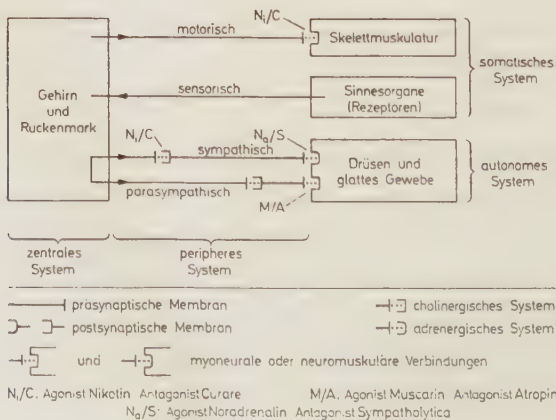
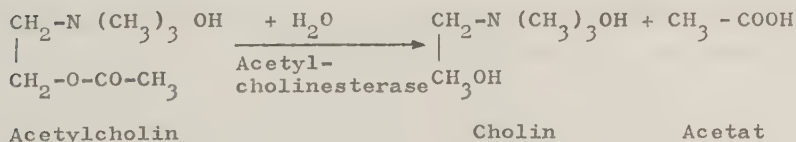


Abb. 6. Schema des Nervensystems

Diese Synapsen bestehen aus einer praesynaptischen Membran (Ende des Dendriten A) und einer postsynaptischen Membran (Beginn des Dendriten B oder des Erfolgsorgans). Zwischen beiden liegt der synaptische Spalt (100 - 200 Å Abstand).

Die Reizung des Nerven führt zu einer vorübergehenden Permeabilitätsänderung an den synaptischen Membranen. Durch Na^+ und K^+ Konzentrationsverschiebungen wird der Reiz weitergegeben (Aktionspotential), HODKIN (1964). Die erhöhte Permeabilität hat nur einige Millisekunden Bestand, anschließend wird der alte schlecht permeable Zustand wieder hergestellt und das Ruhepotential stellt sich wieder ein. Die Permeabilitätssteigerung, und somit auch causal die Reizleitung, wird durch Acetylcholin (an motorischen Endplatten und cholinergen Synapsen) bewirkt.

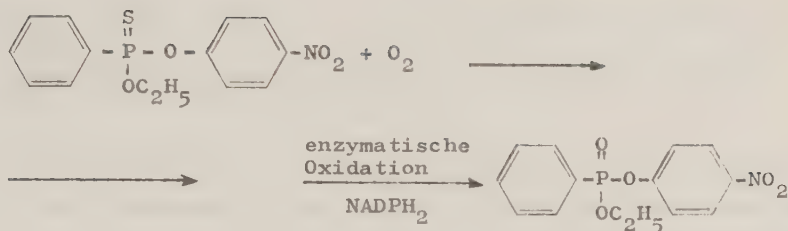
Nach NACHMANSON (1968) verbindet sich das Acetylcholin mit dem Aktionsprotein; dabei soll es zu einer Änderung der Raumstruktur der Synapsenmembran kommen und Na^+ und K^+ ausströmen bzw. ausströmen können. Anschließend wird das Acetylcholin durch die Cholinesterase in Acetat und Cholin gespalten, es verliert dabei seine biologische Wirksamkeit und die Reizweiterleitung wird unterbrochen.



Die biologische Wirkung des EPN während der acuten (cholinergen) Phase ist die Hemmung der Acetylcholinesterase. Dadurch kommt es zu einer Akkumulierung von Acetylcholin an der postsynaptischen Membran und somit zu einer Dauererregung. Die akuten Vergiftungssymptome des EPN sind Folgen dieser Dauererregung von Erfolgsorganen (z.B. Atemlähmung). Neben dieser Acetylcholinesterase (Erythrozytenesterase System Nr. 3.1.1.7) gibt es noch ein zweites Cholinester hydrolysierendes Enzym die Acetylcholin-Acylhydrolase (3.1.1.8) oder Serumcholinesterase. Diese wird ebenfalls gehemmt.

Diese Hemmung gelingt aber nicht durch absolut reines EPN. Reines EPN hat anlaog zu anderen reinen Thiophosphorsäureestern (z.B. Parathion, Malathion) keine inhibitorische Wirkung auf Acetylcholin (DIGGLE und GAGE 1953, DAVISON 1955).

Die enzymatische Oxidation des EPN in ein sauerstoffanalogenes EPN-O muß erst vorangehen, damit es zu einer Cholinesterasehemmung kommt. Bei Vertebraten findet diese Oxidationsreaktion in den Lebermikrosomen (BRODIE und Mitarbeiter 1958) in Gegenwart von NADPH_2 und Sauerstoff statt, bei den Insekten im Fettgewebe, das man der Funktion nach als Leber der Insekten bezeichnen kann:



Dieses EPN-O zeigt im Gegensatz zu reinem EPN auch in vitro eine starke Cholinesterasehemmung (DI STEFANO und HURWITZ 1953, METCALF und MARCH 1953).

Die beiden Acetylcholinesterasen gehören zu einer Gruppe von Hydrolasen, die in ihrem Wirkungsort ähnliche Aminosäuresequenzen unter Beteiligung des Serins enthalten. Man spricht deshalb auch von Serinenzymen.

Nach KOSHLAND (1963) stellt die Reaktion des Acetylcholins mit der Acetylcholinesterase einen dynamischen Prozess dar. Das Acetylcholin induziert bei der Esterase eine Konformationsänderung der Proteinstruktur ihres Wirkungsortes zu einer katalytisch wirksamen Form, das heißt, nur wenige Aminosäuren einer Sequenz sind direkt an der Katalyse beteiligt (Kontaktamino-säuren) und eine Aminosäure, das Serin, reicht als Transferamino-säure aus.

Das aktive Zentrum der Acetylcholinesterase weist zwei Wirkstellen auf:

1. das sogenannte anionische Zentrum.

Es dient zur Fixierung des kationischen Substratteiles über Coulombkräfte.

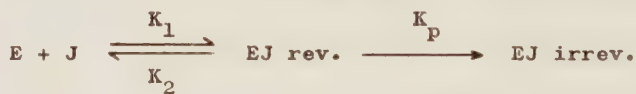
2. das Esterasezentrum:

Es enthält die primäre Alkoholgruppe der Transferamino-säure Serin.

Hier greift das EPN-O ein und geht einen Hemmer-Enzym-Komplex ein. Diese Reaktion stellt eine Phosphorylierung des Acetylcholins durch EPN dar. Der genaue biochemische Ablauf ist noch nicht geklärt.

MAIN (1964) entwickelte unter der Annahme eines reversiblen Primärschrittes in der Reaktion zwischen Esterasen und Phosphorsäureester Gleichungen für die bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeitskonstante. Die Gleichungen enthalten eine Affinitäts- und eine Phosphorylierungskonstante.

MAIN's (1964) kinetisches Schema lautet:



E = Enzym

J = Inhibitor

Der reversible Schritt hängt von der Affinität der Phosphorsäure (allgem. Hemmer) zum aktiven Zentrum der Esterase ab und wird durch die Affinitätskonstante K_a ausgedrückt

$$K_a = \frac{K_2}{K_1}$$

Die irreversible Hemmung wird dagegen durch die Phosphorylierungskonstante K_p festgelegt.

Das gesamte Hemmungspotential des EPN hängt also von der Affinität des EPN zum aktiven Zentrum der Esterase (hier Acetylcholinesterase) und vom Phosphorylierungsvermögen des EPN ab.

Die bimolekulare Reaktionskonstante K_i läßt sich durch K_p und K_a ausdrücken.

$$K_i = \frac{K_p}{K_a}$$

Die Dimension dieser Konstanten beträgt $\text{min}^{-1} \text{Mol}^{-1}$. AWAD und Mitarbeiter (1972) ermittelten aus Ableitungen dieser Main'schen Gleichung die Phosphorylierungs- und Affinitätskonstante von EPN gegenüber Fliegenhirnacetylesterase.

$$\frac{(J) \Delta t}{2,3 \Delta \log v} = \frac{(J)}{K_p} + \frac{1}{K_i}$$

(J) Konzentration des Inhibitors.

$\Delta t/2,3 \Delta \log v$ ist eine nach einer Reaktion erster Ordnung ablaufende Konstante bei Konstanten (J).

Die Ergebnisse von AWAD und Mitarbeiter (1972) sind in der folgenden Tabelle 15 aufgeführt.

Tabelle 15: Hemmung der Acetylcholinesterase durch EPN. Die Affinitätskonstante (K_a) und die Phosphorylationskonstante (K_p) wurde aus Messungen der Werte ($\Delta \log v / \Delta t \pm \text{S.D.}$) bei verschiedenen Konzentrationen (J) EPN bestimmt. K_i ist die bimolekulare Geschwindigkeit der Hemmung des Acetylcholins durch EPN (AWAD und Mitarbeiter 1972)

(J) 10^{-6}M	$2,3 \Delta \log v / \Delta t$ min^{-1}
1	$0,062 \pm 0,004$
2	$0,082 \pm 0,008$
4	$0,126 \pm 0,010$
6	$0,161 \pm 0,013$
8	$0,196 \pm 0,014$
10	$0,212 \pm 0,018$
$K_a = 6,0$	$\pm 0,4 \times 10^{-6} \text{ M}$
$K_p = 0,34$	$\pm 0,03 \text{ min}^{-1}$
$K_i = 5,6$	$\times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$

AWAD und Mitarbeiter (1972) bestimmen in derselben Arbeit die K_a (Affinitätskonstante), K_p (Phosphorylierungskonstante) K_i (bimolekulare Reaktionskonstante) von Malathion. Ein Vergleich der betreffenden Werte von EPN und Malathion zeigt, daß die Geschwindigkeit der Hemmung bei EPN ($K_i = 5,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$) 28 mal größer ist als die von Malathion ($K_i = 2,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$).

Die Phosphorylierungskonstante lag in der gleichen Größenordnung:

$$\text{EPN:} \quad K_p = 0,34 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$$

$$\text{Malathion: } K_p = 0,27 \pm 0,01 \text{ min}^{-1}$$

Die Affinitätskonstante war dagegen bei EPN wiederum größer:

$$K_a (\text{EPN}) = 6,0 \pm 0,4 \times 10^{-6} \text{ M}$$

$$K_a (\text{Malathion}) = 1,33 \pm 0,08 \times 10^{-4} \text{ M}$$

Oft wird das Hemmungspotential auch als J_{50} angegeben, d.h. als die zur 50 %igen Enzymhemmung erforderliche molare Inhibitor-Konzentration oder als pJ_{50} , d.h. als negativer Logarithmus der J_{50} .

Diese Größe bedeutet aber meist nur eine grobe Annäherung an K_p (FEST und SCHMIDT 1970).

b) Hemmung der Aliesterasen durch EPN

Neben der Hemmung der Cholinesterase war bei EPN schon früh bekannt, daß es andere Enzyme hemmt, z.B. Aliesterasen. Dies wurde durch die Potenzierung des Malathions durch EPN bekannt (FRAWLEY und Mitarbeiter 1957, MURPHY und DUBOIS 1957, COOK und Mitarbeiter 1958).

DUBOIS und Mitarbeiter (1968) entwickelten eine quantitative Meßmethode der Hemmung der Aliesterasen durch EPN in

vivo. Dadurch konnten nicht nur Aussagen über Interaktion zwischen Malathion und EPN, sondern auch zwischen EPN und irgendeiner chemischen Substanz, deren Detoxikation durch Aliesterasen bewirkt wird, gemacht werden.

Die Hemmwirkung des EPN auf die Aliesterase (B-esterase, Carboxylesterase) wurde von DUBOIS und Mitarbeiter (1968) durch Messung der Hydrolysenrate von Diäthylsuccinat (es wird wie Malathion durch Carboxylesterase hydrolysiert) bestimmt. Als Substrat wurde Diäthylsuccinat deshalb verwendet, weil Malaoxon (Sauerstoffanaloges von Malathion) selbst die Aliesterasen hemmt (MURPHY 1967, BHAGWAT und RAMACHANDRAN 1975) und deshalb als Substrat die Versuchsergebnisse für EPN verfälschen würde.

DUBOIS und Mitarbeiter (1968) verfütterten verschiedene Mengen (p.p.m.) EPN über einen Zeitraum von 13 Wochen an Ratten und ermittelten nach verschiedenen Zeitabständen, inwieweit die Hydrolyse des Diäthylsuccinat (und somit der Aliesterasen) durch das Leberhomogenat der getöteten Ratten gehemmt wurde. Das Ergebnis zeigte eine dosisabhängige Hemmung der Aliesterasenaktivität.

Eine tägliche Dosis von 0,2 p.p.m. bewirkte keine Hemmung der Hydrolysenrate von Diäthylsuccinat.

Bei 25 p.p.m. wurde eine komplette Hemmung beobachtet. Eine maximale Hemmung der Hydrolysenrate bei Werten von 1,5 und 25 p.p.m. EPN täglich wurde bei einer Fütterungsdauer

von einer Woche erreicht. Mit einer weiteren täglichen Gabe von EPN wurde keine Hemmungssteigerung erreicht. Diese Versuche wurden auch mit dem Serum der getöteten Ratten durchgeführt; dabei erwies sich das Serum als weniger empfindlich als die Leber. Die geringste Dosis, die beim Serum eine Hemmwirkung auf die Hydrolysenrate des Diäthylsuccinat bewirkte, war eine tägliche Menge von 5 p.p.m. EPN.

Die Hemmung entwickelt sich sowohl bei Leberhomogenisat als auch bei Serum nach 4-wöchigem normalen Futter vollkommen zurück.

In folgender Abbildung 7 werden diese Ergebnisse, EPN im Vergleich mit Delnav, noch einmal verdeutlicht.

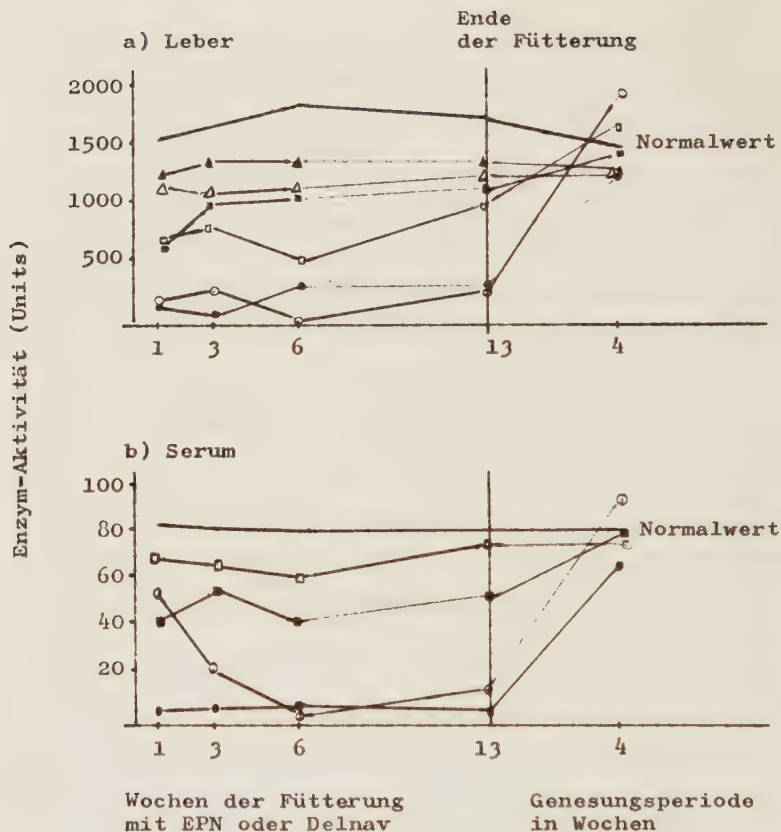


Abb. 7

Hemmungseffekt von verschiedenen täglichen Dosen EPN und Delnav auf die Hydrolyserate von Diäthylsuccinat durch a) Leber und b) Serum von männlichen Ratten (DUBOIS und Mitarbeiter 1968)

- | | |
|--------------|-----------------|
| ● 25 ppm EPN | ○ 25 ppm Delnav |
| ■ 5 ppm EPN | □ 5 ppm Delnav |
| ▲ 1 ppm EPN | △ 1 ppm Delnav |

Bei in vitro Versuchen von BHAGWAT und RAMACHANDRAN (1975) wurde die Hemmung von EPN-O, DFP, Paraoxon und Malaoxon auf die Malathion B-esterase der Mäuseleber untersucht. Als normale Malathion B-esteraseaktivität fanden sie 120 ± 17 $\mu\text{mol/g}$ Leber während einer Stunde. Sie konnten bei männlichen und weiblichen Mäusen keinen Unterschied feststellen.

Die J_{50} für EPN betrug circa 10^{-7} Mol (molare Konzentration bei der eine 50 %ige Enzymhemmung resultiert). Weitere Werte für EPN und die anderen untersuchten Phosphorsäureester können der folgenden Tabelle 16 entnommen werden.

Tabelle 16: Malathion B-esterase-Aktivität in Gegenwart von verschiedenen Konzentrationen von Organophosphaten (BHAGWAT u. RAMACHANDRAN 1975)

Konzentration d. Inhibitors (M)	prozentuale Aktivität der Kontrollaktivität			
	DFP	Paraoxon	EPN-O	Malaoxon
keine	100	100	100	100
10^{-9}	90			
10^{-8}	75	77	93	
10^{-7}	67	60	56	
10^{-6}	23	34	34	
10^{-5}	0-14	0-13		93
10^{-4}	0-12	0-12		50
10^{-3}	0-12	0-12		

Die Wirkung des EPN auf die Hydrolyse des Tributyrin (diese Hydrolyse wird auch durch Leber und Serum-Aliesterasen bewirkt) wurde von DUBOIS und Mitarbeitern (1968) ebenfalls verwendet, um die Hemmung der Aliesterasen in vivo zu messen.

Die Normalaktivität der Tributyrinase in der Leber war in der gleichen Höhe wie die Hydrolysenrate des Diäthylsuccinat, im Serum dagegen war die Tributyrinaseaktivität circa einhalb mal so groß wie die Diäthylsuccinathydrolyse.

Die Hemmung der Enzymaktivität war auch bei Verwendung von Tributyrin als Substrat dosisabhängig. Maximale Hemmung wurde bei der Gabe von täglichen Dosen EPN (1 p.p.m., 5 p.p.m., 25 p.p.m.) nach einer Woche erreicht. Die genauen Verläufe der Hemmung bei den verschiedenen Dosen EPN sind in den folgenden Kurven der Abb. 8 zu entnehmen (EPN wurde hierbei mit Delnav verglichen).

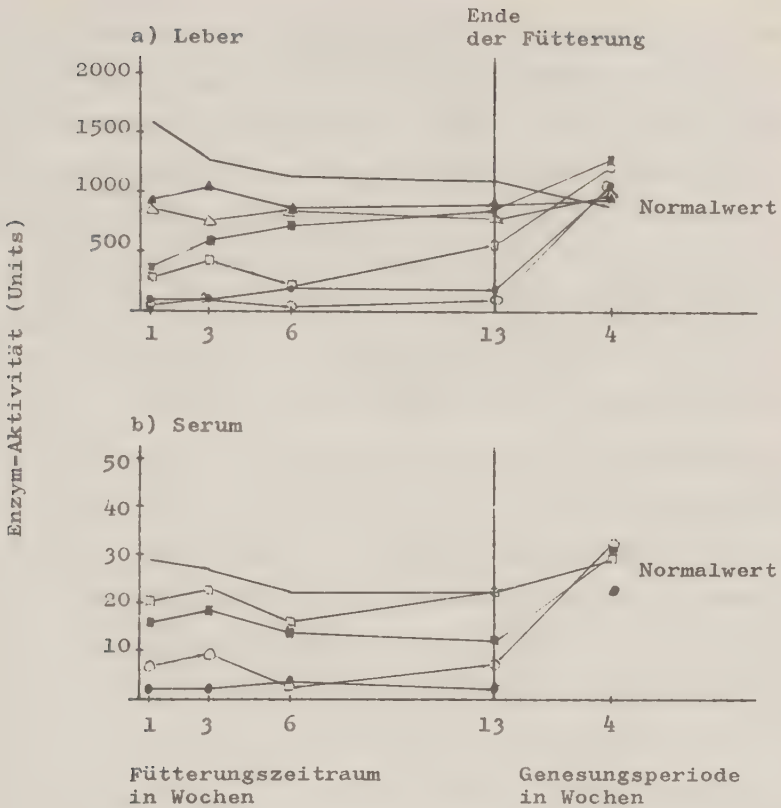


Abb. 8

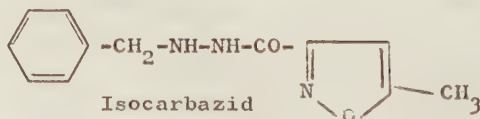
Einfluß von verschiedenen täglichen Dosen EPN und Delnav auf die Hydrolysenrate von Tributyrin durch a) Leber und das b) Serum männlicher Ratten (DUBOIS und Mitarbeiter 1968)

- | | |
|--------------|-----------------|
| ● 25 ppm EPN | ○ 25 ppm Delnav |
| ■ 5 ppm EPN | □ 5 ppm Delnav |
| ▲ 1 ppm EPN | △ 1 ppm Delnav |

Neben der Aliesterase werden durch EPN noch Amidasen gehemmt (DUBOIS und Mitarbeiter 1968, SATOH und MOROI 1973). DUBOIS und Mitarbeiter (1968) untersuchten die Hemmung der Leberacylamidase nach wiederholter Gabe von EPN in vivo. Sie gebrauchten als Substrat Acetanilid. Bei einem täglichen Futteranteil von 1 p.p.m. EPN wurde keine Hemmung der Acylamidase-Aktivität von männlichen Ratten festgestellt, bei weiblichen Ratten war die Hemmung nur gering. Bei 5 p.p.m. und 25 p.p.m. war die Hemmwirkung signifikant.

Von SATOH und MOROI (1973) wurde ebenfalls die Hemmung der Acetanilid-Amidase in vivo und auch in vitro untersucht. Das Ergebnis ihrer Arbeit zeigte auch, daß EPN diese Amidase hemmt. Mit einer einzelnen Dosis EPN von 1,0 mg/kg erzielten sie bei Ratten nach 15 Minuten eine circa 50 %ige Hemmung der Acylamidase, nach 60 Minuten betrug der Wert circa 70 %.

Bei in vitro-Versuchen erhielten sie bei einer Konzentration von 1×10^{-4} eine 16 %ige Hemmung der Acetanilidase. SATOH und MOROI (1973) untersuchten außerdem noch die Hemmung des EPN auf andere Enzyme, neben der Leberacrylamidasen die Aminopeptidase und verglichen sie mit der Wirkung die EPN auf Cholinesterase hat. Als Substrat für die Leberacylamidase verwendeten sie neben Acetanilid Isocarbazid.



Isocarbazid ist ein Monoaminoxidasehemmer der durch die Leberacylamidase in der CO-NH Bindung hydrolysiert wird. Die Aminopeptidase-Aktivität wurde mit Alanyl- β -Naphthylamid (α l- β -NA) als Substrat ermittelt.

Einen Vergleich der gefundenen Daten für EPN gegenüber ISOCCase (Isocarbazid Amidase), AAase (Acetanilid Amidase), ChE (Cholinesterase), Peptidase (Aminopeptidase), sind der folgenden Abbildung 9 zu entnehmen.

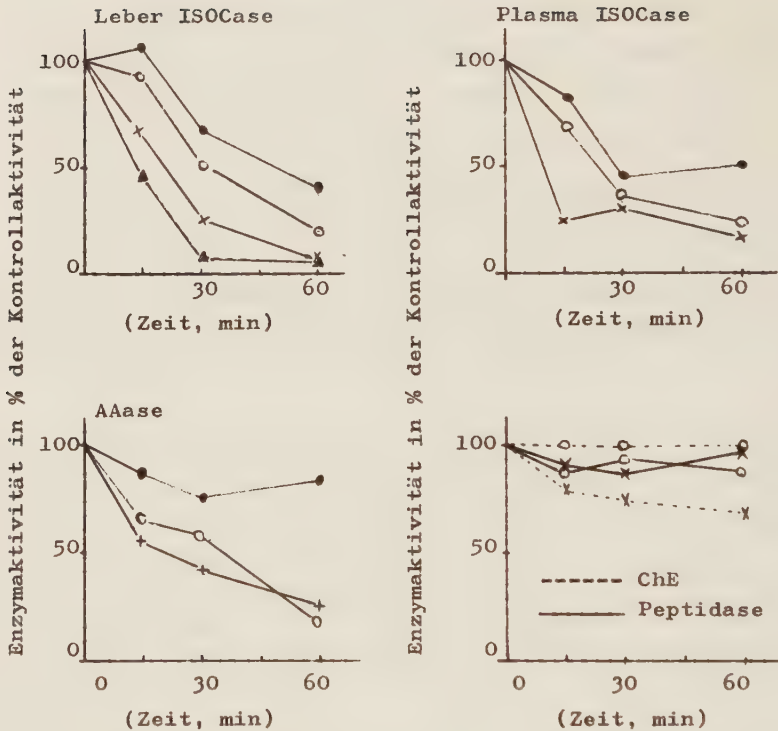


Abb. 9

Wirkung einer einzelnen oralen Gabe von EPN auf die Aktivitäten von Ratten Acylamidasen, -Amino-peptidase und Serumcholinesterase:

15 Minuten, 30 Minuten und 1 Stunde nach Gabe von EPN wurden die Ratten getötet und die Enzymaktivitäten gemessen (SATO und MOROI 1973)

● = 2,5 mg/kg

○ = 5,0 mg/kg

▲ = 15,0 mg/kg

x = 10,0 mg/kg

Die in vivo Versuche erbrachten, daß die Acylamidasen empfindlicher auf EPN ansprechen und bei so kleinen EPN-Dosen, die noch keine Hemmung der Cholinesterase bewirken, schon eine Aktivitätsverminderung der Acylamidasen entsteht (SATOI und MOROI 1973, DUBOIS und Mitarbeiter 1968).

Die ISOCASE ist hierbei empfindlicher als die Acetanilidase (SATOI und MOROI 1973)

Die Peptidase zeigt auf EPN ungefähr die gleiche Empfindlichkeit wie die Cholinesterase (SATOI und MOROI 1973).

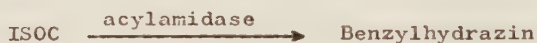
Dies zeigen auch in vitro Versuche, bei denen die Enzymaktivität der ISOCASE, der Acetanilidase und der Peptidase bei verschiedenen EPN-Konzentrationen gemessen wurde. Die Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle 17 enthalten.

Tabelle 17: In vitro-Hemmung der Rattenleberacylamidasen durch EPN (SATOI und MOROI 1973)

EPN Konzentration	E n z y m - A k t i v i t ä t		
	ISOCASE	Acetanilidase	Peptidase
1×10^{-4}	66,8	16,0	0
1×10^{-5}	25,0	12,0	0
1×10^{-6}	7,0	0	0
1×10^{-7}	0	0	0

c) Hemmung der Monoaminoxidase durch EPN

SATOH und MOROI (1973) untersuchten die Relation zwischen der Hemmung der ISOCase und der MAOase durch EPN. In diesem Versuch stellten sie auch die Konzentration des entstandenen Benzylhydrazins fest. Benzylhydrazin entsteht durch Biotransformation aus ISOC und hemmt MAO weit mehr als ISOC:



Nach Gabe von 1 mg/kg EPN peroral an Ratten wurde geprüft, ob EPN zu einer Abnahme der MAO-Aktivität führt. Nach SATOH und MOROI (1973) hemmt EPN die MAO nicht. Bei Gabe von ISOC allein war die Konzentration von BHZ (Benzylhydrazin) doppelt so groß wie bei Gabe von EPN und ISOC. Der inhibitorische Effekt des EPN auf die Hydrolyse von ISOC war der BHZ-Konzentration in der Leber proportional (SATOH und MOROI 1973). Ihre Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle 18 enthalten.

Tabelle 18: Relation zwischen den Aktivitäten der Leber-
Isocarboxazid-Amidase und der Hirn/Leber MAO
sowie der Benzylhydrazin - Konzentration nach
po-Gabe von EPN bei Ratten (SATOH und MOROI 1973)

Behandlung	E n z y m - A k t i v i t ä t			BZH-Konzentration	
	ISOC amidase	Leber MAO	Hirn MAO	Leber	Plasma
Kontrolle	100,0	100,0	100,0	-	-
EPN allein	32,6 $\pm$ 2,3	97,9 $\pm$ 15,0	101,6 $\pm$ 9,1	-	-
ISOC + EPN	33,3 $\pm$ 2,9	25,8 $\pm$ 2,0	12,1 $\pm$ 1,7	0,14 $\pm$ 0,01	0,03 $\pm$ 0,01
ISOC allein	108,7 $\pm$ 8,6	17,8 $\pm$ 0,8	7,5 $\pm$ 0,9	0,24 $\pm$ 0,02	0,08 $\pm$ 0,01

(μ mol/g)

EL SEBAE und Mitarbeiter (1977) untersuchten ebenfalls die Hemmwirkung des EPN auf Monoaminoxidase. Sie gewannen MAO aus Mäusehirn. Als Substrat für MAO verwendeten sie Benzylamin. Aus der Umsetzungsrate zu Benzylaldehyd, die spectrophotometrisch gemessen wurde, wurde die Aktivität der MAO errechnet. Sie fanden, daß EPN die MAO hemmt.

Bei in vitro-Versuchen ergab sich für EPN ein pJ_{50} von 4,10 gegen Monoaminoxidase.

c) Mechanismus der verzögerten neurotoxischen Wirkung
des EPN

Die verzögerte neurotoxische Wirkung ist nach Ansicht von JOHNSON (1975), EL SEBAE und Mitarbeiter (1977) ebenfalls auf eine Esterasehemmung durch EPN zurückzuführen.

JOHNSON (1975) berichtet von einem spezifischen Protein, der sogenannten neurotoxischen Esterase, die bei auf verzögerte Neurotoxizität ansprechenden Tieren im Hirn und Rückenmark vorhanden ist. Das aktive Zentrum dieser Esterase, die Phenyl-Phenylacetat hydrolysiert und welche von anderen Phenyl-Phenylacetat Esterasen analytisch durch ihre Reaktion mit dem Inhibitor unterschieden werden kann (JOHNSON 1969), wird phosphoryliert. In vitro Studien von JOHNSON (1969/70) mit 12 neurotoxischen Phosphorsäureestern und 11 nicht toxischen, zeigten einen deutlichen Zusammenhang zwischen der verzögerten neurotoxischen Wirkung und der Hemmung der neurotoxischen Esterase. EL SEBAE und Mitarbeiter (1977) fanden beim Vergleich von 5 Organophosphorsäuren ebenfalls diesen Zusammenhang. Leptophos und EPN hemmten die neurotoxische Esterase, Clorpyrifos, Phospholan und Stirophos nicht.

Nach JOHNSON (1974) bewirkt die Dosis eines neurotoxischen Organophosphats, die weniger als 70 % der neurotoxischen Esterase hemmt, keine klinischen Symptome.

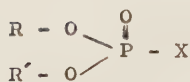
Einige Carbamate und Sulfonylfluoride reagieren covalent mit dem neurotoxischen Phosphorylierungszentrum und hemmen ebenfalls die neurotoxische Esterase. Jedoch bewirken diese Mittel keine Neuropathie, sondern schützen eher vor der neurotoxischen Wirkung von anschließend gegebenen Organophosphaten (JOHNSON und LAUWERYS 1969, JOHNSON 1970). Diese Schutzwirkung hält an bis wieder ungefähr 70 % der aktiven Enzym-Zentren für die Phosphorylierung verfügbar sind (bis zu 7 Tage bei Sulfonylfluoriden).

Hieraus ist klar ersichtlich, daß allein die Hemmung der neurotoxischen Esterase noch keine verzögerte neurotoxische Wirkung nach sich zieht. Ob Ataxie oder Schutz davor aus der Hemmung dieses Enzyms erfolgt, hängt von der Natur der chemischen Gruppe, die covalent an das aktive Zentrum der neurotoxischen Esterase gebunden ist, ab.

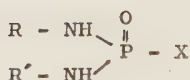
Nach JOHNSON (1974) sind Organophosphate, Phosphoramide und Phosphonate, die die neurotoxische Esterase hemmen, neurotoxisch. Carbamate, Sulfonylfluoride und Phosphine, die inhibitorisch auf die neurotoxische Esterase wirken, zeigen protektive Wirkung.

In der folgenden Abb. 10 werden die Grundstrukturen der Hemmer der neurotoxischen Esterase aufgezeigt.

Gruppe I



Phosphate

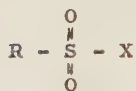


Phosphoramide

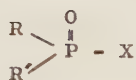


Phosphonate

Gruppe II



Sulfonate



Phosphine



Carbamate

Abb. 10

Strukturvergleich der Hemmer der neurotoxischen Esterase.

Gruppe I wirkt neurotoxisch

Gruppe II wirkt protektiv

R und R' können Alkyl-Gruppen, Aryl-Gruppen oder heterozyklische Substituenten sein.

X ist die Gruppe die nach Reaktion des Inhibitors mit dem Enzym abgespaltet wird.

Die neurotoxische Esterase, die von Phosphinen und Sulfonylfluoriden gehemmt wird, kann nicht einer weiteren Hydrolyse unterzogen werden und ist deshalb nicht neurotoxisch. Durch Carbamate gehemmte neurotoxische Esterase kann an der N-C-Bindung hydrolysiert werden (JOHNSON 1974). Dies ergibt aber ein instabiles Zwischenprodukt und nach Abspaltung von CO_2 wieder ein freies Enzym.

EL SEBAE und Mitarbeiter (1977) ermittelten die pJ_{50} (negativer Logarithmus der Konzentration, bei der 50 % der Aktivität eines Enzyms gehemmt sind) von EPN gegen die neurotoxische Esterase. Als Substrat gebrauchten sie Phenylvalerat.

Als Wert pJ_{50} von EPN gegen die neurotoxische Esterase erhielten sie 5,347 (in vitro ermittelt).

8. Metabolismus des EPN

a) Oxidation und Hydrolyse

Die erste Phase im Metabolismus der Thiophosphate und somit auch des EPN ist die oxidative Desulfurierung. Dieser Schritt bedeutet eine Giftung des EPN. Die Thiophosphate werden erst dadurch zum Anticholinesterase-mittel und somit biologisch wirksam (MURPHY und DUBOIS 1957, HITCHCOCK und MURPHY 1967, NEAL und DUBOIS 1965). Bei Vertebraten findet diese Oxidationsreaktion wie

schon erwähnt, in den Lebermikrosomen (BRODIE und Mitarbeiter 1958) in Gegenwart von NADPH_2 und Sauerstoff statt, bei den Insekten im Fettgewebe, das bei diesen die Funktion der Leber übernimmt. Durch diese Oxidation werden lipophile Thionoverbindungen in die wasserlöslichen Sauerstoffderivate überführt; hierdurch wird auch die Hydrolyse begünstigt.

NEAL und DUBOIS (1965) fanden, daß der Abbau von EPN-O zu p-Nitrophenol mittels Leberhomogenat schneller geht als der von EPN. Bei diesem in vitro Versuch akkumulierte p-Nitrophenol. Hieraus ist klar ersichtlich, daß reines EPN gegen Hydrolyse stabiler ist als EPN-O, daß also durch die Oxidation des EPN die Hydrolyse begünstigt wird. NEAL und DUBOIS (1965) versuchten in in vitro Studien die optimalen Bedingungen zu finden, die beim Metabolismus des EPN zu p-Nitrophenol nötig sind. Dieser Abbau geht nach ihrer Meinung größtenteils in zwei Stufen vor sich: zuerst die oxidative Desulfurierung, dann die Hydrolyse des EPN-O.

Die gefundenen optimalen Bedingungen (Cofaktoren pH) sind in der Tabelle 19 enthalten.

Tabelle 19: Die optimalen Konzentrationen des Substrates und der Cofaktoren für den enzymatischen Abbau von EPN zu p-Nitrophenol (NEAL und DUBOIS 1965)

Substrat oder Cofaktor	μmol a	μg gebildetes p-Nitrophenol/50mg Leberhomogenat/h
EPN	0	0
	0,4	6,4
NADAP	0	0,8
	1,3	8,1
Glukose-6-Phosphat	0	5,5
	2,8	5,9
Nicotinamid	0	5,5
	4,1	6,3

a) Für die Versuche wurde ein Phosphat-Puffer pH 7,8 ($20 \mu\text{mol}$) verwendet.

Der optimale pH-Wert wurde bei Versuchen ermittelt, in denen sich zeigte, daß die Hydrolysenrate pH-abhängig ist und die maximale Aktivität des Hydrolysensystems im Bereich von pH 7,5 bis 8,0 gegeben ist.

Daß der Abbau des EPN zu p-Nitrophenol größtenteils über EPN-O geht, bewiesen NEAL und DUBOIS (1965), indem sie ihre Versuche sowohl in normaler Atmosphäre als auch in Stickstoff-Atmosphäre durchführten. Hierbei zeigte sich, daß unter aeroben Bedingungen die Bildung von p-Nitrophenol 6 mal größer war als unter anaeroben Bedingungen. Außerdem fanden sie, daß Calcium,

Magnesium und Mangan-Ionen keinen Einfluß auf den Metabolismus des EPN haben.

NEAL und DUBOIS (1965) untersuchten, welchen Einfluß verschiedene Konzentrationen von Gewebehomogenat auf die Bildungsrate von p-Nitrophenol aus EPN hatte. Hierbei zeigte sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Gewebekonzentration (im Bereich von 10 mg - 40 mg) und Enzymaktivität. Diese Abhängigkeit wird in Abb. 12 gezeigt.

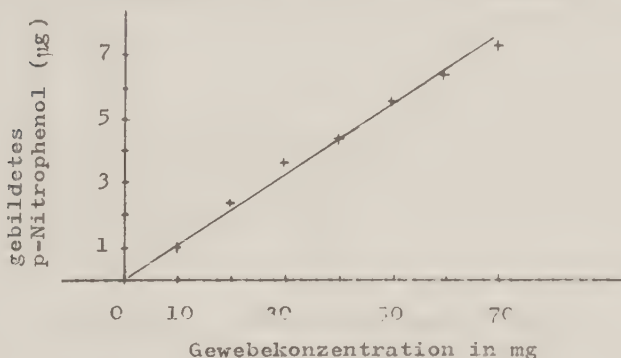


Abb. 12 Abhängigkeit zwischen Gewebekonzentration und Bildungsrate von p-Nitrophenol aus EPN.

In diesem Versuch wurden ansteigende Konzentrationen Leberhomogenat (ausgewachsene männliche Ratten) verwendet. Als Lösung wurde isotone KCl-Lösung genommen, die 0,25 µg Nicotinamid, 20 µmol Phosphatpuffer (pH 7,8), 1,3 µmol NADP, 2,8 µmol Glukose-6-Phosphat und 0,4 µmol EPN enthält. Das Endvolumen war 0,30 ml (NEAL und DUBOIS 1965).

In weiteren Versuchen untersuchten NEAL und DUBOIS (1965) die enzymatische Hydrolyse von EPN-0 und verglichen sie mit der von EPN. Im Testsystem verwendeten sie 0,1 μ mol EPN-0. Reines EPN, das nach ihrer Meinung auch in geringsten Mengen vorhanden war, konnte vernachlässigt werden, da im Testsystem NADP fehlte und man daher sicher sein konnte, daß alles gebildete p-Nitrophenol aus EPN-0 entstand. Es wurde auch gezeigt, daß Mg-, Mn- und Ca-Ionen keinen Einfluß auf die Metabolisierungsrate haben. Auch Glukose-6-Phosphat hat keinen stimulierenden Einfluß (NEAL und DUBOIS 1965).

Bei diesen Versuchen wurde deutlich, daß viele Arten von Rattengewebe EPN-0 hydrolysieren können. In der folgenden Tabelle 20 sind die von NEAL und DUBOIS (1965) gefundenen Werte aufgezeigt.

Tabelle 20: Gewebebezuordnung der Enzyme, die EPN und EPN-0 metabolisieren (Ratten)

Gewebe	gebildetes p-Nitrophenol μ g/50 mg	Organgewebe bzw.
	EPN Körperflüssigkeit	EPN-0
Leber	6,1	89,0
Niere	0,0	67,0
Milz	0,0	31,0
Ileum	0,0	30,0
Herz	0,0	22,0
Serum	0,0	17,0
Lunge	0,0	12,0
Muskel	0,0	3,0
Hirn	0,0	0,0

Die Daten dieser Tabelle zeigen, daß die Bildung von p-Nitrophenol - und somit auch, wie schon BRODIE und Mitarbeiter (1958) fanden, die Oxidation von EPN - in der Leber stattfindet, während p-Nitrophenol aus EPN-O in verschiedenen Geweben gebildet wird. Die Hydrolyserate von EPN-O ist in der Leber auch circa 15 mal so groß wie die von EPN.

Bei Untersuchungen von Abhängigkeit der Metabolisierungsrate vom Alter, vom Geschlecht und der Spezies fanden NEAL und DUBOIS (1965), daß ausgewachsene männliche Ratten EPN stärker metabolisierten als junge männliche Ratten (22 - 25 Tage alt). Diese altersabhängige unterschiedliche Metabolisierung des EPN zu p-Nitrophenol steht in Korrelation zu früher bei akuten Toxizitätstests gefundenen LD_{50} -Werten des EPN für ausgewachsene männliche Ratten und junge männliche Ratten. Ebenso ist die Metabolisierungsrate bei weiblichen Ratten geringer als bei ausgewachsenen männlichen Ratten.

Neben Ratten verwendeten NEAL und DUBOIS (1965) Mäuse und Meerschweinchen als Versuchstiere. Bei Mäusen wurde im Gegensatz zu Ratten kein signifikanter Geschlechtsunterschied in der Metabolisierungsrate von EPN festgestellt. Das Meerschweinchen metabolisierte EPN am raschesten. Hingegen konnte bei gleichen Versuchen, bei denen EPN-O als Substrat verwendet wurde, keine geschlechtsspezifische unterschiedliche Metabolisierungsrate festgestellt werden.

Altersspezifisch war der Unterschied nur ganz gering. Hieraus ergibt sich, daß die art- und altersspezifische unterschiedliche Toxizität des EPN gegenüber Ratten oder anderen Tieren nicht auf die unterschiedliche Geschwindigkeit der Hydrolyse (Detoxikation) begründet ist, sondern auf unterschiedliche Aktivierung des EPN zum EPN-O (NEAL und DUBOIS 1965).

Die Versuchsergebnisse von NEAL und DUBOIS (1965) sind in der nächsten Tabelle 21 enthalten.

Tabelle 21: Art-, geschlechts- und speziesspezifische Unterschiede in der Metabolisierungsrate des EPN und EPN-O (NEAL und DUBOIS 1965)

	gebildetes p-Nitrophenol / μ g/50 mg Leber		
	erwachsen männlich	erwachsen weiblich	junge männlich
RATTEN:			
EPN	5,5 $\pm$ 1,3	1,7 $\pm$ 0,2	2,7 $\pm$ 0,8
EPN-O	87,0 $\pm$ 2,0	87,0 $\pm$ 3,0	72,0 $\pm$ 2,0
MÄUSE:			
EPN	3,6 $\pm$ 0,8	4,0 $\pm$ 0,4	
EPN-O	64,0 $\pm$ 4,0	64,0 $\pm$ 3,0	
MEERSCHWEINCHEN:			
EPN	7,0 $\pm$ 2,7		
EPN-O	42,0 $\pm$ 2,0		

Bei Untersuchungen über die intrazelluläre Lokalisation der Enzyme die EPN und EPN-O hydrolysieren, wurde ein Leberhomogenat von männlichen Ratten durch zentrifugieren in eine Nukleus-Fraktion, eine mitochondriale, eine mikrosomale und eine lösliche Fraktion aufgetrennt. NEAL und DUBOIS (1965). Jede dieser Fraktionen wurde daraufhin untersucht, wie sie EPN und EPN-O abbauen können. Das Resultat ist in der folgenden Tabelle 22 enthalten.

Tabelle 22: Intrazelluläre Lokalisation der Detoxikationsenzyme (Hydrolyse) von EPN und EPN-O (NEAL und DUBOIS 1965)

Fraktion	gebildetes p-Nitrophenol (µg/50 mg Leber)	
	EPN	EPN-O
Nuklei	0,4	37,0
Mitochondrien	0,0	0,0
Mikrosomen	3,6	30,0
lösliche Fraktion	0,0	7,0
gesamtes Homogenat	6,0	87,0
Nuklei u. lösliche Fraktion	0,8	
Mitochondrien und lösliche Fraktion	0,0	
Mikrosomen und lösliche Fraktion	4,2	

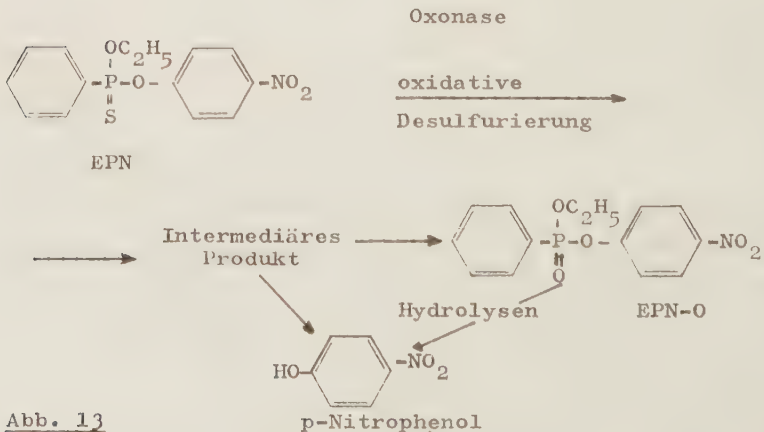
Es zeigt sich, daß die mikrosomale Fraktion die höchste Enzymaktivität gegen EPN enthält. Der geringe Wert bei der Nukleus-Fraktion beruht nach Meinung von NEAL und DUBOIS (1965) wahrscheinlich auf nicht aufgebrochenen Zellen.

Den geringen Aktivitätsanstieg bei Kombination der mikrosomalen und der löslichen Fraktion führen obengenannte Autoren auf eine stabilisierende Wirkung der löslichen Fraktion zurück. Die gesamte Enzymaktivität gegen EPN-O ist in der Nukleus- und mikrosomalen Fraktion enthalten. Die lösliche Fraktion zeigt nur geringe metabolische Aktivität, während die mitochondriale keine zeigt.

Nach NEAL und DUBOIS (1965) kann also die Metabolisierung des EPN (hier Hydrolyse) über zwei Wege verlaufen:

1. größtenteils über die Desulfurierung des EPN zu EPN-O und anschließende Hydrolyse,
2. ein intermediäres Zwischenprodukt bei der oxidativen Desulfurierung wird direkt hydrolysiert, bevor noch das biologisch aktive EPN-O gebildet wird.

Die folgende Abbildung 13 verdeutlicht den von NEAL und DUBOIS (1965) beobachteten Metabolismus (Oxidation und Hydrolyse) des EPN bei Ratten.



Das p-Nitrophenol wird mit dem Urin ausgeschieden, als Vehikel wird Glukuronsäure verwendet.

BRADWAY und Mitarbeiter (1977) untersuchten die Ausscheidung von p-Nitrophenol und Organophosphat-Rückstände im Blut bei Ratten, die mit EPN gefüttert wurden. Hierbei zeigte sich, daß bei einer über 3 Tage verfütterten Dosis von $1/10 \text{ LD}_{50}$ ($\text{LD}_{50} = 36 \text{ mg/kg}$) bei einem Kollektiv von 2 Ratten $1\frac{1}{4} \%$ der gesamten Dosis ausgeschieden war, bei einer Dosis von $1/100 \text{ LD}_{50}$ waren es $25,8 \%$.

Im Blut der Tiere wurden nach 3 Tagen keine Organophosphorsäurerückstände mehr gefunden, im Fettgewebe der Tiere nach 3 Tagen noch $0,06 \text{ p.p.m. EPN}$. Nach 8 Tagen fanden sich auch hier keine Rückstände mehr.

b) Enzymatische Reduktion der Nitrogruppe des EPN

1958 zeigten AHMED und Mitarbeiter, daß neben der Hydrolyse auch die Reduktion der 4-Nitrogruppe von Parathion und Paraoxon zu ihren korrespondierenden Amino-Derivaten die biologische Aktivität (Anticholinesterasewirkung) erheblich senkt.

Die akute Toxizität der Amino-Derivate war circa 100 bis 300 mal geringer als die der Nitro-Derivate. Die oben genannten Autoren bewiesen bei in vitro Versuchen auch, daß im Sekret des Rinderpansens ein Enzymsystem vorhanden ist, das die Nitrogruppe des EPN und des EPN-O zur Aminogruppe reduziert. Diese Nitroreduktion scheint also auch ein Weg im Metabolismus zu sein, um EPN und EPN-O zu entgiften (AHMED und Mitarbeiter 1958, HITCHCOCK und MURPHY 1967).

HITCHCOCK und MURPHY (1967) untersuchten dieses Nitroreduktasesystem in Geweben verschiedener Tierarten (Säugetiere, Vögel und Fische) und seine Wirkung auf EPN, Parathion und Paraoxon. Ihre Experimente zeigten, daß zu diesem Enzymsystem verschiedene Cofaktoren notwendig waren, nämlich NADP, Glukose-6-Phosphat und FAD. HITCHCOCK und MURPHY (1967) studierten die Nitroreduktaseaktivität gegen EPN von verschiedenen Mengen Leberhomogenat (männliche Ratten) bei unterschiedlichen Inkubationszeiten. Hieraus ergab sich eine lineare Abhängigkeit zwischen Gewebekonzentration und Enzymaktivität im Bereich von 10 mg und 40 mg

Leberhomogenat. Ebenso wurde eine lineare Abhängigkeit zwischen Enzymaktivität und Dauer der Inkubationszeit gefunden (bei diesen Versuchen wurden 25 mg Leberhomogenat verwendet). Auch zeigte sich, daß die Nitrogruppe des Parathion schneller reduziert wurde als die des EPN (HITCHCOCK und MURPHY 1967, AHMED und Mitarbeiter 1956). Dies ist aus den folgenden Abbildungen Nr. 14 und 15 ersichtlich.

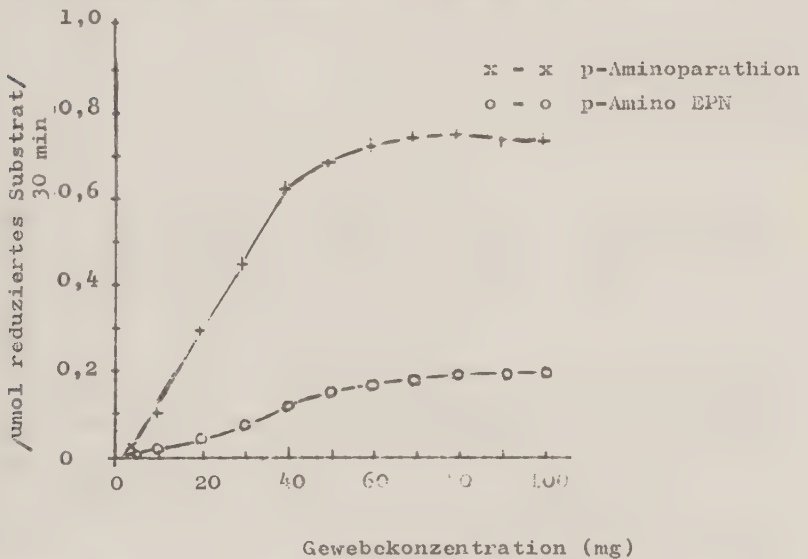


Abb. 14

Reduktion von Parathion und EPN durch verschiedene Mengen Rattenleber (HITCHCOCK und MURPHY 1967)

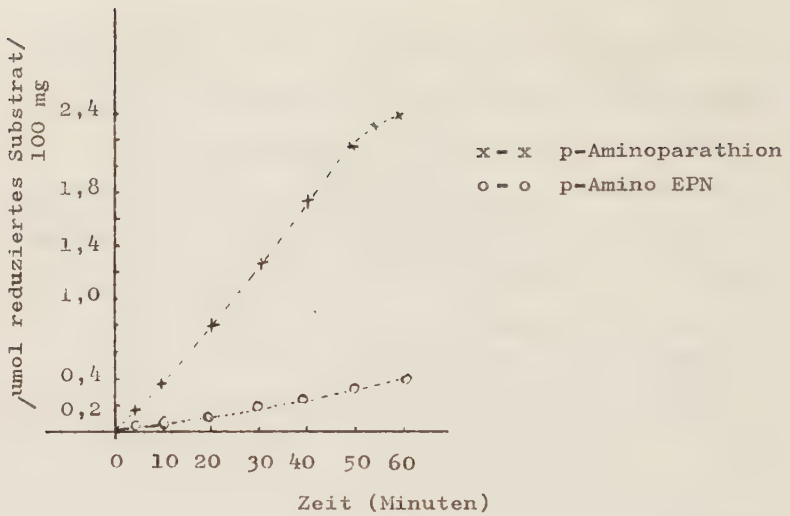


Abb. 15 Reduktionsrate von Parathion und EPN durch Rattenleber (25 mg) (HITCHCOCK und MURPHY 1967)

Beim Vergleich der Reduktionskapazität von Leberhomogenat verschiedener Spezies gegen EPN und Parathion fanden HITCHCOCK und MURPHY (1967), daß von Parathion 4 mal mehr reduziert wird als von EPN.

Die folgende Tabelle 23 enthält die Werte für EPN und Parathion.

Tabelle 23: Reduktion von EPN und Parathion durch Leberhomogenat verschiedener Spezies (HITCHCOCK und MURPHY 1967)

Spezies	Anzahl d. Test- tiere	gebildetes Amino- parathion /umol/100 mg/30 min	gebildetes Amino- EPN /umol/100 mg/30 min
<u>Säugetiere</u>			
Ratten	6	1.256 $\pm$ 0.321	0.254 $\pm$ 0.053
Mäuse	6	1.191 $\pm$ 0.088	0.220 $\pm$ 0.031
Meer- schweinchen	9	0.455 $\pm$ 0.113	0.081 $\pm$ 0.010
<u>Vögel</u>			
Hühner	4	0.518 $\pm$ 0.096	0.090 $\pm$ 0.014
Sperlinge	8	0.196 $\pm$ 0.120	0.052 $\pm$ 0.012
<u>Fische</u>			
Ictalurus melas	6	1.431 $\pm$ 0.162	0.249 $\pm$ 0.027
Casostomus commersoni	3	1.364 $\pm$ 0.063	0.237 $\pm$ 0.014
Pseudopleuro- nectes ameri- canus	5	0.839 $\pm$ 0.184	0.125 $\pm$ 0.015
Myoxocephalus scorpius	5	0.544 $\pm$ 0.190	0.055 $\pm$ 0.018
Micropterus salmoides	4	0.913 $\pm$ 0.281	0.145 $\pm$ 0.032
Lepomis gibbosus	6	0.954 $\pm$ 0.041	0.155 $\pm$ 0.038
Lepomis machrochirus	4	1.093 $\pm$ 0.340	0.180 $\pm$ 0.046
Alosa pseudoharengus	4	0.850 $\pm$ 0.116	0.136 $\pm$ 0.037

Die Nitroreduktion des EPN ist somit eine Möglichkeit der Detoxikation im tierischen Metabolismus. Dies wurde durch in vivo Versuche bewiesen.

AHMED und Mitarbeiter (1958) stellten in vivo Aminoparathion unter den im Urin ausgeschiedenen Metaboliten mit Parathion gefütterter Kühe fest. Bei Ratten konnten sie Aminoparathion im Urin nicht feststellen.

Das Nitroreduktasepotential der Leber ist speziesabhängig. So reduziert z.B. die Leber des Meerschweinchens ungefähr 1/2 mal soviel Parathion und EPN wie die von Mäusen und Ratten. Dennoch sind Ratten und Mäuse gleich empfindlich bzw. empfindlicher gegen die akute Toxizität von Parathion und EPN als ein Meerschweinchen. Bei Säugetieren kann man also zwischen der Lebernitroreduktaseaktivität und der nach Arten unterschiedlichen akuten Toxizität keine Korrelation herstellen (HIRCHCOCK und MURPHY 1967).

9. Stimulierung der Detoxikation des EPN

DI STEFANO und Mitarbeiter (1951) zeigten als erste, daß die akute Toxizität des EPN gegen Ratten durch kombinierte Gabe von Nikethamid und Atropin in höherem Maße reduziert wurde als durch Atropin allein. Diese Toxizitätsverminderung war bei weiblichen Ratten stärker als bei männlichen.

In ihren Tests gaben sie Ratten EPN oral und anschließend sofort Atropin (90 mg/kg) und Nikethamid (120 mg/kg) intraperitoneal. Ihre Versuchsergebnisse sind in der folgenden Tabelle 24 zusammengefaßt. Bei weiblichen Ratten wurde die LD₅₀ des EPN bei Gabe der Kombination von Atropin und Nikethamid auf das zehnfache vermindert, bei Atropin allein auf das zweifache. Bei männlichen Ratten verringert sich durch Kombination von Atropin und Nikethamid die LD₅₀ um das vierfache, bei Atropin um das zweifache. Nikethamid allein zeigte keinen Einfluß.

Dagegen fanden ROSENBERG und COON (1960) sowie DUBOIS und KINOSHITA (1966), daß auch Nikethamid alleine eine große Wirkung hat.

Tabelle 24: Einfluß auf die LD₅₀ bei Gabe von Antidot
1) Atropin, 2) Atropin und Nikethamid
(DI STEFANO und Mitarbeiter 1951)

	weibliche Ratten		männliche Ratten	
	LD ₅₀ mg/kg	Anzahl der Tiere	LD ₅₀ mg/kg	Anzahl der Tiere
EPN	6,7	71	33	95
EPN und Atropin	11,6	50	7½	46
EPN und Atropin u. Nikethamid	71,0	80	120	53

Die Aktivität der Cholinesterase wird nach den in vivo Versuchen von DI STEFANO und Mitarbeiter (1951) nicht beeinflusst.

Nach NEAL und DUBOIS (1965) hängt die Detoxikation des EPN mit einem Leber-Mikrosomen-Oxidasesystem zusammen. Nikethamid induziert die Synthese eines mikrosomalen Enzyms, das die Oxidation von Pentobarbital katalysiert (BRAZDA und BAUCUM 1961). Deshalb erscheint es naheliegend, daß die protektive Wirkung des Nikethamid gegen EPN auf der Induktion der Enzyme beruht, die EPN abbauen (DUBOIS und KINOSHITA 1966, BRODEUR 1967).

In Versuchen bewiesen DUBOIS und KINOSHITA (1966) diese Annahme. Nikethamid erhöhte bei Rattenleber in vitro die Fähigkeit EPN abzubauen.

Ebenso erhöht Phenobarbital, ein bekannter Stimulator des mikrosomalen Enzymsystems, die Aktivität der Detoxikationsenzyme, und reduziert die akute Toxizität des EPN gegen Ratten (DUBOIS und KINOSHITA 1966, BRODEUR 1967). DUBOIS und KINOSHITA (1966) maßen den Abbau des EPN zu p-Nitrophenol bei Induktion des Lebermikrosomenenzymystems durch eine tägliche Gabe von 100 mg/kg Nikethamid und bzw. 50 mg/kg Phenobarbital. Der Versuch lief über 10 Tage. Die erhaltenen Versuchsergebnisse zeigt die nächste Tabelle 25.

Tabelle 25: Steigernde Wirkung von Nikethamid und Phenobarbital auf die Detoxikation von EPN durch die Leber von erwachsenen weiblichen Ratten (DUBOIS und KINOSHITA 1966)

Zeitdauer d. Behandlung	Totale Dosis mg/kg Nikethamid	Enzymaktivität /ug p-Nitrophenol / 50 mg Leber während einer Stunde	
		Durchschnitt*	Verteilung
Kontrolle	0	2,5	2,1 - 3,1
1	100	4,3	4,1 - 5,1
2	200	5,7	4,6 - 8,0
3	300	6,0	5,6 - 8,2
5	500	5,9	4,3 - 6,9
7	700	6,8	6,0 - 8,2
10	1000	6,3	4,8 - 6,4

Phenobarbital			
Kontrolle	0	2,5	2,1 - 3,1
1	50	4,0	3,6 - 4,9
2	100	5,5	5,3 - 5,8
3	150	6,8	4,9 - 9,5
5	250	9,9	8,1 - 14,9
7	350	9,0	8,2 - 10,3
10	500	11,6	10,0 - 13,3

*) errechnet aus einer Gruppe von 4 Ratten

Nikethamid erzielte also nach 3 Tagen eine maximale Enzyminduktion (Detoxikationspotential steigt auf das 3 - 4-fache des Normalwertes). Mit Phenobarbital erreichte man nach 5 Tagen den maximalen Erfolg (4-faches des Normalwertes) (DUBOIS und KINOSHITA 1966).

DUBOIS und KINOSHITA (1966) untersuchten auch die Wirkung (Anstieg und Rückbildung) einer einzigen intraperitonealen Gabe von Phenobarbital (50 mg/kg) bzw. Nikethamid auf das mikrosomale Enzymsystem der Rattenleber. Die vorbehandelten Ratten wurden während des Versuches, der über 7 Tage lief, nach bestimmten Zeiten (z.B. 6 h, 12 h, 24 h nach Versuchsbeginn) getötet und das Detoxikationspotential der Rattenleber gegen EPN gemessen. Bei Nikethamid war nach 12 Stunden noch kein Anstieg zu beobachten, nach 24 Stunden wurde ein Maximum erreicht. Die Aktivität des EPN-Detoxikationssystems entwickelte sich dann wieder während 3 Tage auf Normalwerte zurück. Mit Phenobarbital erzielte man schon nach 12 Stunden einen signifikanten Anstieg und nach 24 Stunden maximale Werte (DUBOIS und KINOSHITA 1966).

Der Induktionseffekt durch Phenobarbital hielt lange an und die Aktivität des EPN-Detoxikationssystems war auch nach 7 Tagen noch nicht auf Normalwerte zurückgegangen. WELCH und COON (1964) haben gezeigt, daß neben Phenobarbital auch Chlorzyklizin oder Zykлизin Mäuse signifikant vor der akuten Toxizität des EPN schützt.

BRODEUR (1967) untersuchte die Wirkung des Phenobarbitals

auf die Anticholinesteraseaktivität des EPN (Versuchstiere Ratten). Maximale Wirkung zeigte Phenobarbital erst nach 2 Tagen (tägl. Dosis 50 mg/kg Phenobarbital). Seine Versuchsergebnisse, die Cholinesteraseaktivität wurde im Hirn, Serum und in der Glandula submaxillaris gemessen, sind in der nächsten Abbildung 16 enthalten.

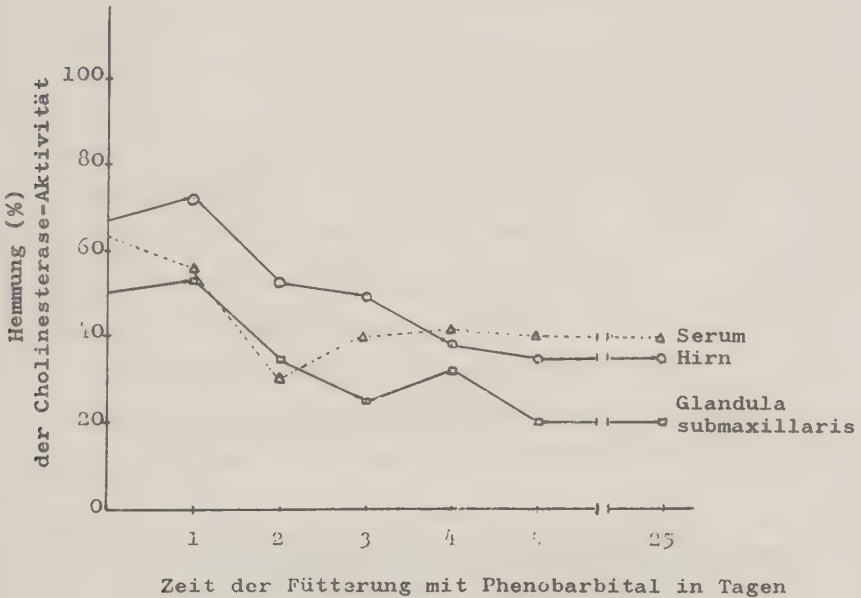


Abb. 16

Wirkung wiederholter Gabe von Phenobarbital auf die Anticholinesteraseaktivität des EPN bei ausgewachsenen weiblichen Ratten (BRODEUR 1967)

In der Folgezeit wurde die Induktion des mikrosomalen EPN-Detoxikationssystems auch noch durch andere chemische Stoffe nachgewiesen.

CHEN und DUBOIS (1973) zeigten die Enzyminduktion an Rattenleber durch polychlorierte Biphenyle.

WAGSTOFF (1973 a, b) fand, daß Cadmiumacetat und Quecksilberacetat bei Ratten ebenfalls die Enzyme der Lebermikrosomen stimulieren und daß somit das EPN schneller abgebaut wird. 1975 untersuchten CHADWICK und Mitarbeiter die Altersabhängigkeit der Enzyminduktion durch Dieldrin und DDT. Innerhalb von 24 Stunden nach Gabe von Dieldrin (ip) zeigten junge Ratten eine signifikant höhere EPN-Detoxikationsaktivität als ausgewachsene mit Dieldrin behandelte Ratten. Ratten die über ein Jahr mit 5 p.p.m. DDT täglich gefüttert wurden, zeigten eine basale erhöhte Enzymaktivität gegen EPN gegenüber unbehandelten. Eine anschließende Dosis Dieldrin (2,5 mg/kg) führte aber zu keiner weiteren Enzyminduktion.

Pentobarbital, so bewies KENNEDY und Mitarbeiter (1975), führt bei Ratten ebenfalls zu einer Erhöhung des EPN-Detoxikationspotentials.

KRAMPL und HLADKA (1975) untersuchten die Dosisabhängigkeit der mikrosomalen Enzyminduktion durch Aldrin und Dieldrin. Dieldrin war zur Enzyminduktion wirkungsvoller als Aldrin.

Sie erhielten eine dosisabhängige Enzyminduktion durch Dieldrin und Aldrin. Diese Abhängigkeit wird in der nächsten Abbildung 17 gezeigt.

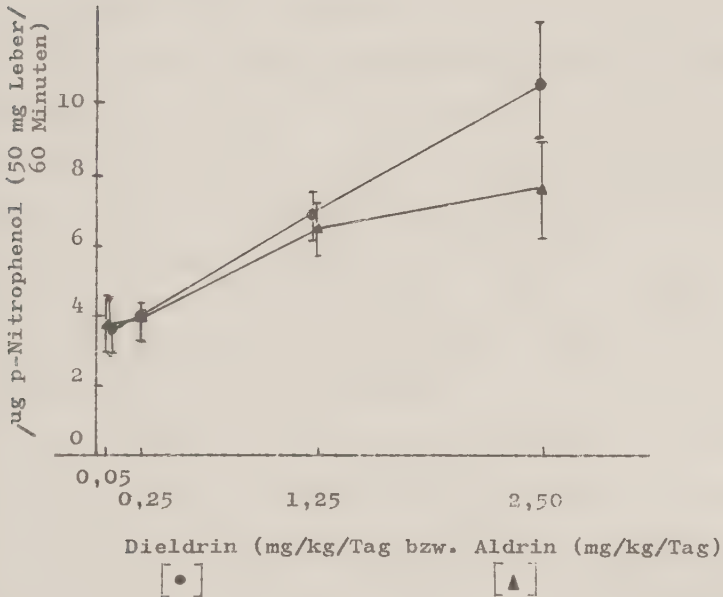


Abb. 17

Abhängigkeit der Induktion des Leber-EPN-Detoxikationssystems von verschiedenen täglichen Dosen Dieldrin bzw. Aldrin. Die Enzymaktivität wurde 24 h nach Gabe der letzten Dosis Dieldrin bzw. Aldrin gemessen. Insgesamt wurde über 13 Tage Dieldrin bzw. Aldrin täglich oral gegeben (KRAMPL und HLADKA 1975)

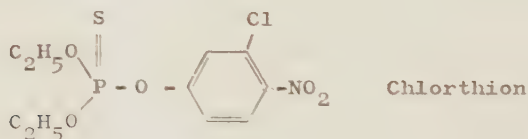
C) DICAPTHON

1. Synthese des Dicapthons

SCHRADER (1954) zeigte, daß die Einführung von Methoxygruppen anstelle von Äthoxygruppen im Parathion zu einer insektizid gut wirksamen Verbindung führte, die aber eine wesentlich verringerte warmblütertoxische Wirkung hat. Von Methylparathion ausgehend wurden die Versuche weitergeführt. In der Folgezeit versuchte SCHRADER (1954) systematisch den p-Nitrophenylrest abzuändern.



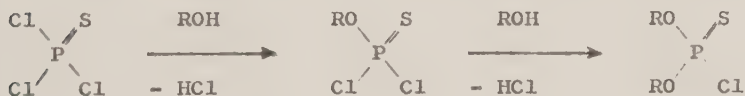
Im Zuge dieser Arbeiten stieß er schließlich bei den Farbenfabriken Bayer, Leverkusen, auf Chlorthion (DBP 921870, eingeführt 1952). Bei dieser Substanz wurde ein Chloratom in o-Stellung zur Nitrophenylgruppe gebracht. Dadurch wurde die Warmblüter-Toxizität im Vergleich zu Methylparathion herabgesetzt.



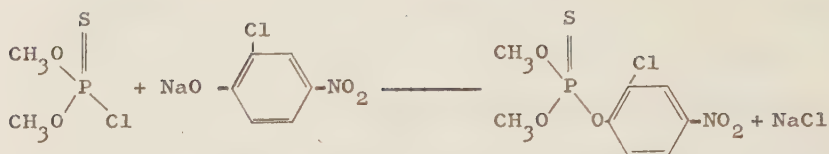
1954 wurde eine weitere verwandte Substanz von der American Cyanid Co. eingeführt.

Bei dieser Substanz, dem Dicapthon (chemischer Name: O,O-Dimethyl-O-(-2 Chlor-4 Nitrophenyl)Thionophosphorsäureester) steht das Chloratom in 2-Stellung im Phenylrest. Die insektiziden und toxischen Eigenschaften wurden hierdurch wieder ungünstiger.

Die Synthese des Dicapthons geht, wie schon anfangs bei EPN besprochen, von elementarem Phosphor über wichtige Phosphorverbindungen, z.B. Phosphortrichlorid, Phosphoroxylchlorid, Thiophosphorchlorid, Phosphorsäureesterchloride zum Dicapthon. Dieses erhält man, indem man Thiophosphorsäurechlorid PSCl_3 mit Alkohol bzw. Alkoholat wie bei FLETCHER und Mitarbeiter (1948) angegeben wird, umgesetzt.



Bei der Synthese von Dicapthon wird Methanol oder Methylalkoholat verwendet. Anschließend wird 2-Chlor-p-nitrophenolnatrium mit O,O-Dimethylthionophosphorsäurechlorid phosphoryliert. Das 2-Chlor-p-nitrophenolat kann nach PLAZEK (1930) durch Chlorieren von p-Nitrophenolat erhalten werden.



Dicapthon ist ein weißes cristallines Pulver. Der Schmelzpunkt beträgt 52 - 53° C. Es ist gut löslich in aromatischen Kohlenwasserstoffen, sowie in halogenierten Kohlenwasserstoffen der alipathischen und aromatischen Reihe.

Die Löslichkeit in Wasser beträgt ungefähr 35 mg/Liter (MELNIKOW 1971).

2. Acute Toxizität des Dicapthons

GAINES (1960) testete die acute orale und dermale Toxizität von Organophosphorsäureestern, unter anderem auch die des Dicapthons, gegen Ratten.

Als orale LD₅₀ von Dicapthon erhielt er 400 mg/kg (männliche ausgewachsene Tiere). Die von ihm gefundenen LD₅₀-Werte des Dicapthons werden in der nächsten Tabelle 26 mit der LD₅₀ von EPN, Parathion und Malathion verglichen.

Tabelle 26:

Acute orale und dermale Dicapthons im Vergleich
zum Parathion, EPN und Malathion gegen ausgewachsene Ratten
(GAINES 1960)

	m ä n n l i c h e			LD ₅₀ mg/kg	w e i b l i c h e			
	Anzahl der ver- wendeten Tiere	Überlebenszeit Minimum (Stunden)	Maximum (Tage)		Anzahl der ver- wendeten Tiere	Überlebenszeit Minimum (Stunden)	Maximum (Tage)	LD ₅₀ mg/kg
DICAPTHON								
oral	49	5	5	400	60	21	4	330
dermal	50	96	10	790	90	45	17	1250
PARATHION								
oral	50	1	3	13	70	2	3	3,6
dermal	50	24	3	21	80	1	4	6,8
EPN								
oral	80	2	10	36	80	48	5	7,7
dermal	100	48	11	230	80	1	7	25
MALATHION								
oral	60	1	12	1375	67	1	1	1000
dermal	10	72	9	> 4444	10	48	9	> 4444

Die Gefährlichkeit des Dicapthons für Säugetiere ist also bei weitem geringer als die des Parathions und EPN. Sie ist aber größer als die des Malathions.

Über Interaktionen zwischen Dicapthon und anderen chemischen Verbindungen sind in der verfügbaren Literatur keine Angaben enthalten.

3. Neurotoxische Wirkung des Dicapthons

GAINES (1969) testete verschiedene Organophosphorsäureester auf ihre Fähigkeit hin, verzögert neurotoxische Symptome bei Hühnern auszulösen. Er untersuchte neben dem EPN auch das Dicapthon. Nach seinen Ergebnissen (siehe Tabelle 27) zeigt auch Dicapthon einen neurotoxischen Effekt.

Tabelle 27: Der neurotoxische Effekt von EPN und Dicapthon bei mit Atropin behandelten Hühnern (GAINES 1969)

ORGANO- PHOSPHAT	Neurotoxischer Effekt			
	Niedrigste letale Dosis	Höchste Dosis, die keine Wirkung zeigt	niedrigste Dosis, die Wirkung zeigt	Dauer der neurotoxi- schen Sym- ptome in Tagen
	mg/kg	mg/kg	mg/kg	
DICAPTHON	300	100	200	3 - 30
EPN	80	20	40	6 - > 330

Die bei den Hühnern beobachteten neurotoxischen Zeichen entwickelten sich im Falle des Dicapthons innerhalb von 30 Tagen vollständig zurück, dagegen gingen die durch EPN hervorgerufenen während des Beobachtungszeitraumes von 330 Tagen nicht zurück (GAINES 1969). Es dürfte also bei Dicapthon zu keiner irreversiblen Nervenschädigung, wie sie bei EPN bewiesen ist (FRAWLEY und Mitarbeiter 1956), kommen.

4. Anwendung des Dicapthons

Dicapthon wird als Fliegenmittel eingesetzt (FEST und SCHMITT 1970).

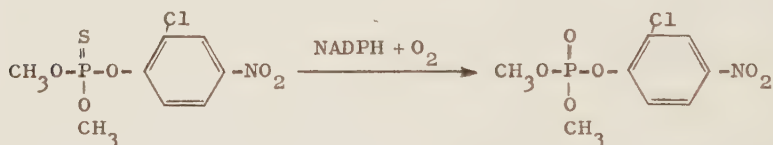
Bei geringerer Säugetiertoxizität als EPN und Parathion hat Dicapthon die gleiche Wirkung gegen Schadinsekten im Erbsenanbau (pea aphids) wie Parathion (DAVICH und APPLE 1951).

Ebenso kann es gut gegen Schädlinge in Baumwollkulturen angewandt werden. Hier wirkte es gegen cotton aphids toxischer als Parathion (GAINES und Mitarbeiter 1951).

5. Wirkungsmechanismus des Dicapthons

a) Anticholinerge Wirkung des Dicapthons

Dicapthon wirkt als Anticholinesterasemittel, um so wirken zu können, muß es aber erst vergiftet werden. Dies geschieht wie bei anderen Thiophosphaten durch oxidative Desulfurierung.



Dieses Sauerstoffanalogue von Dicapthon geht mit der Cholinesterase einen Hemmer-Enzym-Komplex ein.

Nach MAIN (1964) geht diese Reaktion in zwei Schritten vor sich (wie bei EPN genau beschrieben). Der reversible Schritt hängt von der Affinität des Dicapthons zum aktiven Zentrum der Esterase ab und wird durch die Affinitätskonstante K_a ausgedrückt. Der irreversible zweite Schritt wird durch die Phosphorylierungskonstante K_p festgelegt.

Die bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeit des Dicapthons ist

$$K_i = \frac{K_p}{K_a} \quad (\text{min}^{-1} \text{ Mol}^{-1}).$$

MEHROTRA und PHOKELA (1969) untersuchten die Affinitäts-, Phosphorylierungskonstante und bimolekulare Geschwindigkeitsrate des Sauerstoffanaloges des Dicapthons und verglichen sie mit den Konstanten von Paraoxon, Methylparaoxon und Sumioxon.

Die von den obengenannten Autoren gefundenen Werte für K_a und K_p sind in der folgenden Tabelle 28 zu finden.

Tabelle 28: Affinitätskonstante K_a für verschiedene Organophosphate gegen Hirn-Cholinesterase von Sperlingen, Ratten und Heuschrecken (MEHROTRA und PHOKELA 1969)

	K_a (Affinitätskonstante) $\cdot 10^{-7}$ Mol		
	Sperlinge	Ratten	Heuschrecken
Paraoxon	3,77	17,63	115,70
Methylparaoxon	16,92	60,13	83,53
Oxygenanalogue von Dicapthon	51,11	97,12	144,71
Sumioxon	181,46	331,35	170,20

Die Affinitätskonstante K_a zeigt die Tendenz des Enzym-Inhibitor-Komplexes wieder zu dissoziieren. Ein kleinerer K_a -Wert bedeutet eine stärkere Bindung des Inhibitors an das Enzym.

Gegen Sperlingshirn-Cholinesterase hat also Paraoxon eine circa 14-fach höhere Affinität als das Oxygenanalogue von Dicapthon. Die Affinitätskonstante ist speziesabhän-

gig. Sie verringert sich in folgender Reihenfolge: Heuschrecken, Ratten und Sperlinge.

Ebenso sind die Phosphorylierungskonstanten speziesabhängig, wie die folgende Tabelle 29 zeigt.

Tabelle 29: Phosphorylierungskonstante K_p von verschiedenen Organophosphaten (MEHROTRA und PHOKELA 1969)

	$K_p \text{ (min}^{-1}\text{)}$		
	Sperlinge	Ratten	Heuschrecken
Paraaxon	8,64	7,06	7,40
Methylparaaxon	24,33	9,07	6,82
Oxygenanalogen von Dicapthon	39,72	12,96	7,52
Sumioxon	17,57	8,54	6,91

Die von MEHROTRA und PHOKELA (1969) erhaltenen K_i -Werte ($K_i = \frac{K_p}{K_a}$) sind der nächsten Tabelle 30 zu entnehmen.

Tabelle 30: Bimolekulare Geschwindigkeitskonstante K_i für verschiedene Organophosphate gegen Hirn-Cholinesterase von Sperling, Ratte und Heuschrecke

	Sperlinge	Ratten	Heuschrecken
Paraaxon	2,29	0,40	0,06
Methylparaaxon	1,44	0,15	0,08
Oxygenanalogen von Dicapthon	0,78	0,13	0,05
Sumioxon	0,06	0,03	0,04

Einheit von $K_i = X \cdot 10^7 \text{ Mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$

b) Hemmung anderer Enzymsysteme durch Dicapthon

In der verfügbaren Literatur sind keine Angaben zu finden, ob Dicapthon außer der Cholinesterase noch weitere Enzyme, wie z.B. Aliesterasen, Monoaminoxidase oder die neurotoxische Esterase hemmt.

6. Metabolismus des Dicapthons

Dicapthon wird analog wie andere Thiophosphate, z.B. EPN, Parathion im Körper einer Oxidation unterzogen. Dies bedeutet eine Giftung, erhöht die Wasserlöslichkeit und macht es zugänglicher gegen Hydrolyse. Durch enzymatische Hydrolyse wird es dann abgebaut. Als Metabolit wird 2-Chlor-4-nitrophenol mit dem Harn ausgeschieden (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT 1976).

Untersuchungen über eine Reduktion der NO_2 -Gruppe des Dicapthons zu einer Aminogruppe sind in der verfügbaren Literatur nicht zu finden.

D) KLINIK, THERAPIE und PROPHYLAXE BEI VERGIFTUNGEN
MIT ORGANOPHOSPHATEN

1. Vergiftungen durch EPN und Dicapthon beim Menschen

Über acute Vergiftungen speziell durch EPN oder Dicapthon sind in der verfügbaren Literatur keine Angaben zu finden. Es wird meist allgemein über Vergiftungen mit Organophosphorsäuren oder speziell mit E 605 (bekannteste Verbindung aus der Gruppe der Organophosphate) berichtet.

Die Symptomatik jeder Organophosphorsäurevergiftung, somit auch die durch EPN oder Dicapthon, ist durch die Kumulation von Acetylcholin gegeben. Die Schwere der Vergiftungserscheinungen richtet sich nach der aufgenommenen Menge des Organophosphates und seiner Giftigkeit.

Typische Symptome sind vermehrter Speichel- und Tränenfluß. Es kann zu Schweißausbrüchen kommen. Die Nasen- und Bronchialsekretion ist auch verstärkt. Es bestehen Sehstörungen, meist eine Miosis, daneben Kopfschmerzen, Angstgefühle, Nausea, Erbrechen, Darmkoliken, Diarrhoe, Bradycardie, Blutdrucksenkung, Dyspnoe und Zyanose, Ataxie, Muskelschwäche, Erregungszustände, fibrillare Muskelzuckungen und eventuell tonisch-klonische Krämpfe.

Schließlich kommt es zu Lähmungen und zum Exitus letalis infolge zentral- oder peripherbedingter Atemlähmung. Es können aber auch paradoxe Symptome wie Mydriasis, Tachy-

cardie und Hypertonie als Zeichen schwerer Intoxikation auftreten (LUDEWIG und LOHS 1966).

Über chronische Vergiftungsfälle durch Dicapthon sind ebenfalls keine Angaben zu finden.

Für EPN wird jedoch über eine chronische Vergiftung mit Dauerschäden berichtet (PETTY 1958).

Der von PETTY (1958) geschilderte Fall wird kurz berichtet. Ein 44-jähriger Mann war in einer experimentellen Landwirtschaftsstation beschäftigt. Bei der Vorgeschichte ist nur von einer fieberhaften Krankheit, von undulierendem Fiebertyp und einer acuten Appendicitis zu berichten. Im Frühjahr 1952 war der Patient vollkommen gesund. Zur selben Zeit wurde an seinem Arbeitsplatz auch mit einem Versuchsprogramm zur Insektenbekämpfung begonnen. Es wurden verschiedene Insektizide, nämlich Parathion, EPN, DDT, Dieldrin und auch Arsenverbindungen angewandt. Der Mann kam mit diesen Insektiziden dauernd in Berührung. Es wurden dabei keine besonderen Vorsichtsmaßnahmen wahrgenommen. Im April 1952, ungefähr einen Monat nach Versuchsbeginn, klagte der Patient über Kopfschmerzen, Übelkeit und allgemein über Schmerzen, besonders im Abdomen und im Bereich der Blase. Hierauf wurde eine Zystoskopie durchgeführt. Es wurden aber keine Veränderungen gefunden. Die Ursache der Bauchschmerzen wurde nicht gefunden. Der Patient verließ das Krankenhaus jedoch in merklich besserem

Zustand. Er kehrte wieder zu seinem Arbeitsplatz zurück und hatte im Herbst und Winter keinen Kontakt mit Insektiziden.

Im Herbst 1952 bemerkte er einen leichten Anflug von Gelbsucht, der aber bis zum Frühling 1953 abklang. Ab März 1953 arbeitete er wieder mit Insektiziden. Wieder traten Bauchkrämpfe und Übelkeit auf, der Patient hatte wenig Appetit und nahm ab. Jetzt kam es erneut zu einer Gelbsucht. Wegen dieser und auch wegen der anderen Symptome kam er wieder ins Krankenhaus. Hier wurde eine Laparatomie mit Cholezystektomie durchgeführt. Die intra operationem dargestellten Gallengänge waren unauffällig und auch die Leber schien normal. Nach der Operation klang die Gelbsucht ab.

Nach der Rückkehr zu seiner Arbeit klagte er erneut über Bauchkrämpfe (August 1953). Während des späten Herbsts und Winters kam er mit den Insektiziden nicht in Kontakt und fühlte sich viel besser. Im Frühjahr 1954 wurde das Projekt wieder aufgenommen. Kurz danach begann der Patient ähnliche Symptome wie während der zwei vorangegangenen Saisonen aufzuweisen. Außerdem zeigte er Nervosität und unsicheren Gang. Daneben war Schlaflosigkeit ein hervorstechendes Symptom. An einem Tag im Mai 1954 wurde der Patient von seiner Familie bewußtlos auf dem Boden liegend gefunden. Im Krankenhaus wurde die Organophosphatvergiftung behandelt. Der Patient sprach gut

auf Atropin an und erlangte nach mehreren Stunden wieder das Bewußtsein.

Während seines Krankenhausaufenthaltes fühlte er sich sehr schwach und klagte über Parästhesien an den Extremitäten. Ebenfalls wurden Gleichgewichtsstörungen registriert. Die Plasmacholinesterase betrug anfangs 34 %, die Erythrozytencholinesterase 37 % des Normalwertes. Circa 7 Wochen später betrug der Plasmawert 100 %, der Erythrozytenwert 75 %. Einen Monat nach der ersten Cholinesterasebestimmung betrug ihr Wert im Plasma 206 % und in den Erythrozyten 85 % der Norm. Es gab zu keiner Zeit den Beweis einer Metallvergiftung. Trotz der Normalisierung der Cholinesterasewerte litt der Patient auch weiterhin an Schwäche, Müdigkeit, Schlaflosigkeit, Gleichgewichtsstörungen und anderen Symptomen.

Diese Symptome waren auch bei der letzten ärztlichen Untersuchung im September 1956 feststellbar. Es war keine erwähnenswerte Besserung eingetreten. Zur Zeit dieser Untersuchung war der Patient abgemagert und er zeigte an den Händen einen Tremor.

Ebenfalls war die Koordination gestört, die Zeigeversuche (Finger-Nase) wurden unsicher durchgeführt. Das Gehör wurde nicht getestet. Aber in einem Audiogramm wurde im Januar 1956 ein Hörverlust von 36 % rechts und von 37 % links festgestellt. Das EEG war normal.

Für PETTY (1958) war damals der kausale Zusammenhang der dauernden Nervenschäden mit dem EPN noch nicht gegeben, er wußte noch nicht von der verzögerten neurotoxischen Wirkung, die EPN auslöst. Er glaubte, daß diese Schäden eventuell aus der Kombination der Organophosphorsäuren Parathion und EPN entstanden.

2. Therapeutische Maßnahmen nach Vergiftungen mit Organophosphorsäuren (z.B. EPN und Dicapthon)

Die schon besprochenen chemischen Verbindungen, die das mikrosomale Enzymsystem induzieren, z.B. Phenobarbital und Nikethamid, können nach Vergiftungen mit Organophosphaten nicht eingesetzt werden, denn die Enzyminduktion kommt erst nach einiger Zeit zum Tragen und erreicht ihren Maximalwert oft erst nach einigen Tagen. Oft ergeben diese Mittel (z.B. Aldrin) nach einer EPN-Vergiftung anstelle von protektiver eine potenzierende Wirkung (TRIOLO und COON 1966).

Die therapeutischen Maßnahmen sind heute folgende:

- 1) Sicherung der Vitalfunktionen
- 2) Sofortige ausreichende Atropindosierung
- 3) Schnelle und gründliche Entfernung noch nicht resorbierter Giftmengen
- 4) Applikation eines Cholinesteraseaktivators
(Toxogonin)

Mit der spezifischen Atropinbehandlung versucht man die muskarinartigen Wirkungen der Organophosphorsäureester aufzuheben (ERDMANN und LENDLE 1958).

Eine kausale Therapie wird mit dem Cholinesteraseaktivator Toxogonin versucht (ERDMANN und VON CLARMANN 1963, BARCKOW und Mitarbeiter 1969).

Das Obidoxim (Toxogonin) kann zum Teil die Blut-Hirn-Schranke durchbrechen und somit besser als PAM (ebenfalls ein Cholinesteraseaktivator) zentralnervös wirken (ERDMANN 1965). Nach neuesten Ergebnissen glaubt man, daß Zuckeroxime noch besser die Blut-Hirn-Schranke überwinden und somit wirksamer sind (RACHAMAN und Mitarbeiter 1979).

Als Wirkungs- und Verlaufskontrolle der Therapie wird die ständige Messung der Cholinesteraseaktivität verwendet (ERDMANN und LENDLE 1958, BARCKOW und Mitarbeiter 1969).

3. Möglichkeit zur Verhütung acuter und chronischer Vergiftungen

Die richtige Handhabung durch gelernte Kräfte bietet die beste Sicherheit vor acuten und chronischen Vergiftungen. Es sollten bei der Handhabung Atemschutzgeräte und Gummikleidung getragen werden, um Aufnahme durch die Haut oder

die Atemwege zu vermeiden. Die wichtigste Maßnahme zur Erkennung einer etwaigen Phosphorsäureesterexposition und somit zur Verhütung von Vergiftungen ist die regelmäßige Überwachung der Cholinesteraseaktivität aller mit der Herstellung oder der Handhabung Beschäftigten (ULLMANN 1962).

E) DISKUSSION

Zu Beginn der Arbeit wird kurz die Geschichte der Organophosphate gestreift. Es wurde der Versuch unternommen, neue Ester zu finden, deren Warmblütertoxizität verringert, deren Toxizität gegen Insekten aber unverändert hoch ist. So wurde zum Beispiel 1949 das EPN und 1954 das Dicapthion eingeführt.

Im Anschluß daran wird zuerst über das EPN berichtet. Die Synthese der Phosphorsäureester und speziell des EPN geht von elementarem Phosphor über wichtige Phosphorverbindungen zum Wirkstoff. Dies wird allgemein an einem Schema gezeigt. Bei EPN wird das leicht zugängliche Benzolthiophosphonsäuredichlorid zuerst mit Alkohol umgesetzt und dann wird das zweite Chloratom durch den p-Nitrophenolrest ersetzt (PERKOW 1963, FEST und SCHMITT 1970).

Für die Verwendung und Sicherheit des EPN ist besonders die Frage nach der Warmblütertoxizität von Wichtigkeit. Die Toxizität des EPN, die sich mit der LD_{50} objektivieren läßt, ist von verschiedenen Parametern abhängig, zum Beispiel Weg der Aufnahme (peroral, subcutan, i.v., etc), dem Geschlecht und der Art.

Die Toxizität läßt sich nach JARCZYK (1966) als Quotient der enzymatischen Oxidation und der enzymatischen Hydrolyse ausdrücken.

Über die per orale acute Toxizität der LD₅₀ von EPN gegen männliche ausgewachsene Ratten werden unterschiedliche Werte angegeben. Die LD₅₀ reicht von 35 mg/kg bis 91 mg/kg (DUBOIS 1963, GAINES 1960, FRAWLEY und Mitarbeiter 1952, HODGE und Mitarbeiter 1954).

Die Warmblütertoxizität von EPN ist zwar geringer als die von Parathion, deren per orale LD₅₀ gegen ausgewachsene männliche Ratten im Bereich von 5 - 30 mg/kg liegt (HAZLETON 1955), aber um ein vieles höher als die von Malathion (LD₅₀ 533 - 1375 p.o. männliche Ratten) (GAINES 1960, HAZLETON und HOLLAND 1953, HAZLETON 1955).

Die LD₅₀ Werte beziehen sich nur auf das Racemat von EPN. Da EPN ein asymmetrisches Phosphoratom besitzt, sind Stereoisomere möglich. Sie besitzen gegen Mäuse eine annähernd gleiche Toxizität, gegen Hennen aber wirkt das (-)-EPN 4 mal so toxisch als das (+)-EPN (OHKAWA und Mitarbeiter 1977).

Nach HODGE und Mitarbeiter (1954) führen auch toxische Langzeitversuche (tägl. Gabe bei männlichen Ratten bis 150 p.p.m. EPN über 2 Jahre) zu keinen toxisch bedingten Spätschäden.

1957 berichteten FRAWLEY und Mitarbeiter als erste über den Synergismus des EPN mit Malathion. Das Problem der gegenseitigen Wirkungsbeeinflussung der Organophosphorsäuren war durch Kombinationsbehandlung in der Landwirt-

schaft von großer Bedeutung geworden. Es stellte sich nämlich die Frage, ob der Verbraucher beim Verzehr von mit verschiedenen Organophosphaten behandelten Lebensmitteln nicht durch Interaktionen gefährdet ist. Zwar waren schon Toleranzwerte für Nahrungsmittel festgesetzt worden (EPN 3 p.p.m., Malathion 8 p.p.m.), aber es war unsicher, ob diese bei Kombination zweier Organophosphorsäuren nicht zu hoch seien. 1957 bewiesen FRAWLEY und Mitarbeiter, daß EPN und Malathion im Gemisch gegen Hunde eine 50-fach erhöhte Toxizität besitzt. Auch bei extrem niedrigen Dosen, die den Toleranzwerten nahekommen, tritt noch eine Potenzierung der Toxizität ein. MOELLER und RIDER (1960) zeigten aber, daß es bei Einnahme der Toleranzwerte des EPN und des Malathions zu keinen Gesundheitsschäden beim Menschen kommt und sie absolut sicher sind. Die Potenzierung der Toxizität des Malathions durch das EPN beruht auf der Hemmung der Hydrolyse des Malaoxons durch Aliesterasen.

EPN wirkt als Carboxylesterasehemmer (COOK und Mitarbeiter 1958, MURPHY und DUBOIS 1957, KNAAK und O'BRIEN 1960, DUBOIS 1961, DUBOIS und Mitarbeiter 1968).

In neuester Zeit wurde darüber berichtet, daß EPN eine verzögerte neurotoxische Wirkung zeigt (GAINES 1969, ABOU DONIA und Mitarbeiter 1978). Es gibt über diese Wirkung des EPN auch schon früher Angaben (DURHAM und Mitar-

beiter 1956, FRAWLEY und Mitarbeiter 1956). Damals wurde diese Wirkung nicht sonderlich beachtet. Erst in jünger Zeit stellt sich die Frage, ob ein Mittel, das verzögert neurotoxische Wirkung zeigt, überhaupt tragbar ist. Die Gefahr einer verzögerten neurotoxischen Wirkung auf den Menschen ist nämlich eindeutig gegeben. PETTY (1958) beschreibt einen solchen Vergiftungsfall beim Menschen.

Nach OHKAWA und Mitarbeiter (1977) löst nur das Racemat und (-) -EPN verzögert neurotoxische Wirkung aus, nicht jedoch (+) -EPN. Nach ABOU DONIA und Mitarbeiter (1978) ist dies aber nicht der Fall, sondern alle Isomere wirken neurotoxisch, nur sind bei (+) -EPN die neurotoxischen Symptome wesentlich leichter.

KHERA und Mitarbeiter (1966) zeigen auch, daß EPN teratogen wirkt.

Die Anwendung des EPN erstreckt sich gegen Schadinsekten (z.B. rote Zitrusmilbe) im Obst- und Gemüsebau. Nach Einsatz von EPN muß eine Wartezeit zwischen 3 und 30 Tagen eingehalten werden, damit EPN auf dem Obst bzw. Gemüse genügend abgebaut ist und die Rückstände unter dem vertretbaren Toleranzwert liegen. Die Wartezeiten lassen sich aus den Halbwertszeiten für EPN berechnen. Sie sind je nach Pflanzensorte unterschiedlich, z.B. betragen sie bei Pfirsichen 8 - 10 Tage (BRUNSON und KOBLITSKY 1952,

FAHEY und Mitarbeiter 1952).

Der Mechanismus der acuten Toxizitätswirkung des EPN liegt in seiner Anticholinesterasewirkung begründet. EPN kann aber erst nach Giftung zum Sauerstoffanalogen mit der Enzym-Cholinesterase einen Enzym-Hemmer-Komplex bilden (MURPHY und DUBOIS 1957, HODGE und Mitarbeiter 1954). Nach MAIN (1964) läuft diese Reaktion in zwei Schritten ab: erstens einem reversiblen Schritt, der durch die Affinitätskonstante K_a ausgedrückt wird, zweitens den irreversiblen Schritt, der durch K_p beschrieben wird. $\frac{K_p}{K_a}$ ist die bimolekulare Reaktionskonstante. AWAD und Mitarbeiter (1972) ermittelten für EPN

K_a mit $6,0 \pm 0,4 \times 10^{-6} \text{ M}$,

K_p mit $0,34 \pm 0,03 \text{ min}^{-1}$ und

K_i mit $5,6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ min}^{-1}$

Neben der Cholinesterase werden aber noch andere Enzymsysteme gehemmt, so die Aliesterasen (DUBOIS und Mitarbeiter 1968), die Acetanilid-Amidase, die Isocarbazidamidase (SATO und MOROI 1973) und die Amino-peptidase.

Die Monoamidoxidase wird nach SATO und MOROI (1973) durch EPN nicht gehemmt. Nach EL SEBAE und Mitarbeiter (1977) trifft dies nicht zu. Als pJ_{50} gegen MAO ermittelten sie 4,10.

Die verzögerte neurotoxische Wirkung des EPN ist nach JOHNSON (1974), EL SEBAE und Mitarbeiter (1977) ebenfalls auf eine Esterasehemmung zurückzuführen.

Nach obengenannten Autoren wird ein spezifisches Protein - die neurotoxische Esterase - gehemmt, dies schädigt das Neuron, was sekundär zur Degeneration des Axons führt (CAVANAGH 1954). EL SEBAE und Mitarbeiter (1977) ermittelten als pJ_{50} (negativer Logarithmus der Konzentration bei der 50 % der Aktivität eines Enzyms gehemmt sind) von EPN gegen die neurotoxische Esterase 5,347.

Die Abbauvorgänge des EPN laufen größtenteils in der Leber über oxidative Desulfurierung, was eine Giftung bedeutet. Anschließend wird EPN-O in verschiedenen Geweben oder Körperflüssigkeiten zu p-Nitrophenol hydrolytisch entgiftet (NEAL und DUBOIS 1965, siehe S. 84, Tab. 20). In geringem Maße ist nach NEAL und DUBOIS (1965) aber auch eine direkte Hydrolyse des EPN über ein intermediäres Produkt zum p-Nitrophenol möglich, ohne daß vorher EPN-O entsteht. p-Nitrophenol wird dann als Metabolit mit dem Harn ausgeschieden.

Einen anderen gangbaren Weg der Entgiftung für EPN zeigten AHMED und Mitarbeiter (1958), HITCHCOCK und MURPHY (1967) in der Reduktion der 4-Nitrogruppe zur Aminogruppe. Hier wurde Amino-EPN, Amino-EPN-O im Urin von Kühen als Metabolit nachgewiesen (AHMED und Mitarbeiter 1958).

Eine Steigerung der Detoxikation des EPN kann man in vivo nach DI STEFANO und Mitarbeiter (1951), ROSENBERG und COON (1960) und DUBOIS und KINOSHITA (1966) mit Nikethamid erreichen. Ebenso wirkt Phenobarbital. Nikethamid und Phenobarbital induzieren das Detoxikationssystem des EPN (DUBOIS und KINOSHITA 1966, BRODEUR 1967). Diese Enzyminduktion kann aber nur zum Tragen kommen, wenn man Phenobarbital oder Nikethamid lange vor der Verabreichung von EPN gibt. Diese chemischen Verbindungen können also nicht zur Therapie verwendet werden. Andere chemische Verbindungen wie Dieldrin (CHADWICK und Mitarbeiter 1975) und polychlorierte Biphenyle bewirken ebenfalls eine Induktion des EPN-Detoxikationssystems.

Über den Phosphorsäureester Dicapthon sind in der verfügbaren Literatur nur spärliche Angaben zu finden. Dicapthon wird aus 2-Chlor-p-nitrophenolnatrium und O,O-Dimethylthionophosphorsäurechlorid synthetisiert. Die orale und dermale acute Toxizität des Dicapthons wird mit 400 mg/kg (oral gegen männliche Ratten) bzw. 790 mg/kg (dermal gegen männliche Ratten) angegeben (GAINES 1960).

Es ist also damit weit weniger giftig als EPN, kommt aber noch nicht an Malathion heran (LD_{50} oral 1375 mg/kg).

GAINES (1969) schreibt dem Dicapthon auch neurotoxische Wirkung zu. Die bei Gabe von Dicapthon an Hühnern beobachteten verzögert auftretenden neurotoxischen Symptome

bilden sich aber im Gegensatz zu den von EPN vollständig zurück. Es dürfte also bei Dicapthon zu keiner irreversiblen Nervenschädigung kommen.

Mit Dicapthon werden gute Erfolge in der Bekämpfung von Fliegen erzielt. Es ist teilweise dem Parathion überlegen (GAINES und Mitarbeiter 1951).

Dicapthon wirkt wie EPN als Anticholinesterasemittel. Die bimolekulare Reaktionsgeschwindigkeit des Sauerstoffanalogon von Dicapthon gegen Rattenhirncholinesterase beträgt $K_i = 0,13 \times 10^7 \text{ Mol}^{-1} \text{ min}^{-1}$.

Über die Hemmung anderer Enzyme, z.B. Aliesterasen, MAO oder neurotoxische Esterase sind in der verfügbaren Literatur keine Angaben zu finden.

Der Abbau des Dicapthons im Körper geht analog wie der anderer Thiophosphate vor sich. Dicapthon wird oxidiert (gegiftet) und dann hydrolysiert. Als Metabolit der enzymatischen Hydrolyse wird 2-Chlor-4-nitrophenol mit dem Harn ausgeschieden (GELDMACHER-v.MALLINCKRODT 1976).

Über acute Vergiftungen beim Menschen speziell durch EPN und Dicapthon sind in der verfügbaren Literatur keine Angaben zu finden. Es wird meist allgemein über Vergiftungen durch Anticholinesterasemittel oder speziell durch E 605 berichtet. Die Symptome dieser Vergiftung

sind dieselben, wie z.B. vermehrter Speichel und Tränenfluß, Bradycardie, Darmkoliken, fibrilläre Zuckungen etc. (LUDEWIG und LOHS 1966). Schließlich kommt es zu Lähmungen und zum exitus letalis.

Über eine chronische Vergiftung durch EPN mit dauerndem neurologischem Schaden berichtet PETTY (1958).

Als therapeutisches Mittel der Wahl bei acuter Organophosphorsäureestervergiftung (z.B. EPN, Dicapthon) steht nach wie vor Atropin - ein Parasympatolytikum - an erster Stelle. Außerdem versucht man die gehemmte Cholinesterase z.B. mit Toxogonin zu reaktivieren (ERDMANN und LENDLE 1958). Nach RACHAMAN und Mitarbeiter (1979) glaubt man mit Zuckeroximen noch bessere Cholinesterasereaktivatoren als es das Toxogonin ist, gefunden zu haben.

Gegen chronische Vergiftungen mit Organophosphorsäuren bietet die vorsichtige gewissenhafte Handhabung dieser Gifte die beste Sicherheitsmaßnahme. Außerdem sollte vorsichtshalber bei allen, die mit der Herstellung oder Handhabung dieser Mittel beschäftigt sind, regelmäßig die Cholinesteraseaktivität gemessen werden.

F) ZUSAMMENFASSUNG

Nach einer kurzen Darstellung der geschichtlichen Entwicklung der Organophosphorsäuren wird die Synthese des EPN erläutert. Anschließend wird ausführlich über die acute und chronische Toxizität des EPN berichtet. Daneben wird noch der Synergismus des EPN und des Malathions und sein Wirkungsmechanismus behandelt. Es folgt dann ein Kapitel über die verzögerte neurotoxische Wirkung und Teratogenität des EPN.

Nach einem Überblick über die Anwendungsmöglichkeiten des EPN schließt sich ein Kapitel über den Wirkungsmechanismus des EPN gegen die Cholinesterase, die Aliesterasen, die MAO und die neurotoxische Esterase an. Dann wird auf den Metabolismus des EPN eingegangen: Oxidation, Hydrolyse, Nitroreduktion. Ein weiteres Kapitel befaßt sich mit den Möglichkeiten, die Detoxikation des EPN zu stimulieren. Anschließend wird über den zweiten zu behandelnden Organophosphorsäureester, das Dicapthon, berichtet. Nach der Synthese des Dicapthons wird auf seine acute Toxizität und verzögerte neurotoxische Wirkung eingegangen, danach wird der Wirkungsmechanismus und der Metabolismus des Dicapthons behandelt.

Am Schluß der Arbeit wird auf acute und chronische Vergiftungen durch EPN und Dicapthon eingegangen und die Möglichkeiten gezeigt, diese zu therapieren bzw. zu verhindern.

G) LITERATURVERZEICHNIS

ABOU DONIA, M.B.:

Delayed neurotoxicity of phenylphosphonothioate esters.
Science 205, 713 (1979)

ABOU DONIA, M.B., D.G. GRAHAM:

Delayed neurotoxicity of O-Ethyl-O-4-nitrophenyl phenylphosphonothioate: Subchronic (90 days) oral administration in hens.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 45, 685 (1978)

ABOU DONIA, M.B., A.A. NOMEIR, W.C. DAUTERMANN:

Stereospecificity of delayed neurotoxic and cholinergic effects of EPN and EPN-Oxon optical isomers.

Pharmacologist 20, 179 (1978)

AHMED, M.K., J.E. CASIDA, R.E. NICHOLS:

Bovine metabolism of organophosphorus insecticides: significance of rumen fluid with particular reference to Parathion.

J. Agric. Food Chem. 6, 740 (1958)

ALDRIDGE, W.N., J.M. BARNES:

Neurotoxic side-effects of certain organophosphorus compounds.

Proc. Eur. Soc. Study Drug Toxicity, Int. Cong. Series No. 118, Neurotoxicity of Drugs, Excerpta Med. Found., Amsterdam 8, 162 (1967)

ANONYMUS:

The chronic oral toxicity of EPN to young chickens.

In: Summary of Investigations Vol. 13, 37 (1968)

US Department of Health, Education and Welfare, Communicable Disease Center Technology Branch, Atlanta, Ga.

ARTHUR, B.W., J.E. CASIDA:

Metabolism and selectivity of O,O-Dimethyl-2,2,2-trichloro-1-hydroxyethyl phosphonate and its acetyl and vinyl derivatives.

J. Agric. Food Chem. 5, 186 (1957)

AWAD, O., Y. GABR, M. OSMAN:

Phosphorylation and affinity constants of the inhibition of brain acetylcholinesterase by organophosphorus anticholinesterases.

Arzneim. Forsch. 22, 1035 (1972)

BARCKOW, D., G. NEUHAUS, W.D. ERDMANN:

Zur Behandlung der schweren Parathion (E 605)-Vergiftung mit dem Cholinesterase-Reaktivator Obidoxim (Toxogonin).

Arch. Toxikol. 24, 133 (1969)

BHAGWAT, V.M., B.V. RAMACHANDRAN:

Malathion A and B esterases of mouse liver.

Biochem. Pharmacol. 24, 1713 (1975)

BRADWAY, D.E., T.M. SHAFIK, E.M. LORES:

Comparison of cholinesterase activity, residue levels and urinary metabolite excretion of rats exposed to organophosphorus pesticides.

J. Agric. Food Chem. 25, 1553 (1977)

BRAZDA, F.G., R. BAUCUM:

The effect of nikethamide on the metabolism of pentobarbital by liver microsomes of rat.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 132, 295 (1961)

BRODEUR, J.:

Studies on the mechanism of phenobarbital - induced protection against Malathion and EPN.

Canad. J. Physiol. Pharmacol. 45, 1061 (1967)

BRODIE, B.B., J.R. GILETTE, B.N. LA DU:

Enzymatic metabolism of drugs and other foreign compounds.

Annual Rev. Biochem. 27, 427 (1958)

BRUNSON, M.H., L.A. KOBLITSKY

Parathion, DDT and EPN desposits on peach foliage and fruit.

J. Econ. Entomol. 45, 952 (1952)

CASIDA, J.E., M. ETO, R.L. BARON:

Biological activity of a tri-O-cresyl phosphate metabolite.

Nature (London) 191, 1396 (1961)

CAVANAGH, J.B.:

The toxic effects of tri-ortho-cresyl phosphate on the nervous system (An experimental study in hens).

J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry 17, 163 (1954)

CAVANAGH, J.B.:

Peripheral neuropathy caused toxic agents.

CRC Crit. Rev. Toxicol. 2, 365 (1973)

CHADWICK, R.W., R.S. LINKO, J.J. FREAL, A.L. ROBBINS:

The effect of age and long-term low-lewel DDT exposure on the response to enzyme induction in the rats.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 31, 469 (1975)

CHEN, T.S., K.P. DUBOIS:

Studies on the enzyme inducing effect of polychlorinated biphenyls.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 26, 504 (1973)

COFFIN, D.E.:

Residues of Parathion, Methylparathion, EPN and their oxons in Canadian fruits and vegetables.

Residue Rev. 7, 61 (1964)

COOK, J.W., J.R. BLAKE, G. YIP, M. WILLIAMS:

Malathionase: Activity and Inhibition.

J. Assoc. Offic. Agr. Chemists 41, 399 (1958)

DAVICH, T.B., J.W. APPLE:

Pea aphid control with contact and systemic insecticidal sprays.

J. Econ. Entomol. 44, 528 (1951)

DAVISON, A.N.:

Conversion of Schradan and Parathion into inhibitors of cholinesterase by mammalian liver.

Biochem. J. 61, 203 (1955)

DECKER, G.C., C.J. WEINMANN, J.M. BAIN:

A preliminary report on the rate of insecticide residue from treated plants.

J. Econ. Entomol. 43, 919 (1950)

DEICHMANN, W.B., W. PUGLIESE, J. CASSIDY:

Effects of dimethyl and diethyl paranitrophenyl thiophosphate on experimental animals.

Arch. Ind. Hyg. 5, 44 (1952)

DIGGLE, W.M., J.C. GAGE:

Cholinesterase inhibition in vitro by Parathion.

Biochem. J. 49, 491 (1951)

DI STEFANO, V., L. HURWITZ:

The development of an anticholinesterase substance in highly purified EPN.

Arch. Biochem. and Biophys. 47, 228 (1953)

DI STEFANO, V., L. HURWITZ, W.F. NEUMANN, H.C. HODGE:
Coramine (Nikethamide) as adjuvant to atropine in
treatment of poisoning by EPN.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 78, 712 (1951)

DUBOIS, K.P.:

Potentiation of the toxicity of organophosphorus
compounds.

Advan. Pest Control Res. Rev. 4, 117 (1961)

DUBOIS, K.P.:

Toxicological evolution of the anticholinesterase
agents.

In: Cholinesterases and Anticholinesterases agents.
Handbook experiment. Pharmak. Ergänzungswerk 15, 833
Springer-Verlag, Berlin 1963

DUBOIS, K.P., J. DOULL, P.R. SALERNO, J.M. COON:

Studies on the toxicity and mechanism of action of
p-nitrophenyl diethyl thionophosphate (Parathion).

J. Pharmacol. Exp. Ther. 95, 79 (1949)

DUBOIS, K.P., F. KINOSHITA:

Stimulation of detoxification of O-Ethyl-O-(4-nitro-
phenyl) Phenylphosphonothionate (EPN) by Nikethamide
and Phenobarbital.

Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 121, 59 (1966)

DUBOIS, K.P., F.K. KINOSHITA, J.P. FRAWLEY:

Quantitative measurement of inhibition of aliester-
ases, acylamidases and cholinesterase by EPN and DELNAV.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 12, 273 (1968)

DURHAM, W.F., T.B. GAINES, W.J. HAYES

Paralytic and related effects of certain organic
phosphorus compounds.

Arch. Ind. Hlth. 30, 326 (1956)

EL SEBAE, A.H., S.A. SOLIMAN, M. ABO ELAMYEM, N.S. AHMED:
Neurotoxicity of organophosphorus insecticides Leptophos and EPN.

J. Environ. Sci. Health /Part B Pestic. Food Contam.
B 12, 269 (1977)

ERDMANN, W.D.:

Vergleichende Untersuchungen über das Penetrationsvermögen einiger esteraseaktivierender Oxime in das zentrale Nervensystem.

Arzneim. Forsch. 15, 135 (1965)

ERDMANN, W.D., M. von CLARMANN:

Ein neuer Esterase-Reaktivator (Toxogonin) für die Behandlung von Vergiftungen mit Alkylphosphaten.

Dtsch. med. Wschr. 88, 2201 (1963)

ERDMANN, W.D., L. LENDLE:

Vergiftungen mit Esteraseblockierenden Insektiziden aus der Gruppe der organischen Phosphorsäureester.

Ergebn. inn. Med. Kinderheilk. 10, 104 (1958)

ETO, M., J.E. CASIDA, T. ETO:

Hydroxylation and cyclisation reaction involved in the metabolism of tri-O-cresyl phosphate.

Biochem. Pharmacol. 11, 337 (1962)

FAHEY, J.W., D.W. HAMILTON, R.W. RUIGS:

Longevity of Parathion and related insecticides in spray residues.

J. Econ. Entomol. 45, 700 (1952)

FEST, C., K.J. SCHMIDT:

Insektizide Phosphorsäureester.

In: Chemie der Pflanzenschutz- und Schädlingsbekämpfungsmittel, Band 1, 246

Springer-Verlag, Berlin-New York 1970

FINNEY, D.J.:

Probit Analysis: A statistical treatment of the sigmoid curve.
Cambridge Univ. Press, London 1952

FISHER, E.B., J.R. van WALZER:

Use of organic phosphorus compounds biological functions and applications.

In: Phosphorus and its compounds. Vol. II Technocology 1897 (1961)

FLETCHER, J.H., J.C. HAMILTON, J. HECHENBLEIKNER, E.J. HOEGBERG, B.J. SERTL, J.T. CASSADY:

Preparation of O,O-Diethyl-O-nitrophenyl thiophosphate (Parathion).

J. Am. Chem. Soc. 70, 3943 (1948)

FRAWLEY, J.P.:

Test protocols and limitations for detection of neurotoxicity.

In: Proceedings of a conference on Pesticide-induced delayed Neurotoxicity.

National Technical Information Service, Springfield (Virginia) p. 234 (1976)

FRAWLEY, J.P., H.N. FUYAT, E.C. HAGAN, J.R. BLAKE, O.G. FITZHUGH:

Marked Potentiation in mammalian toxicity from simultaneous administration of two anticholinesterase compounds.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 121, 96 (1957)

FRAWLEY, J.P., E.C. HAGAN, O.G. FITZHUGH:

A comparative pharmacological and toxicological study of organic phosphate anticholinesterase compounds.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 105, 156 (1952)

FRAWLEY, J.P., R.E. ZWICKEY, H.N. FUYAT:

Myelin degeneration in chicks with subacute administration of organic phosphorus insecticides.

Fed.Proc.Fed.Amer.Soc.Exp.Biol. 15, 424 (1956)

FREHSE

Rückstände von Pflanzenschutzmitteln in Nahrung und Umwelt.

In: Chemie der Pflanzenschutz- u. Schädlingsbekämpfungsmittel, Band 2, 433

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1970

GAGE, J.C.:

Cholinesterase inhibitor derived from O,O-diethyl-O-p-nitrophenyl thiophosphate in vivo.

Biochem. J. 54, 426 (1953)

GAINES, J.C., E.E. IVY, C.E. KING:

Toxicity of certain phosphorus compounds to cotton insects.

J. Econ. Entomol. 44, 750 (1951)

GAINES, T.B.:

The acute toxicity of pesticides to rats.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 2, 88 (1960)

GAINES, T.B.:

Acute toxicity of pesticides.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 14, 515 (1969)

GELDMACHER-v.MALLINCKRODT, M.:

Einfache Untersuchungen auf Gifte im klinischen Laboratorium.

Klinische Chemie in Einzeldarstellungen, Band 2
Thieme-Verlag, Stuttgart 1976

GUNTHER, F.A.:

Insecticide residues in California citrus fruits and products.

Residue Rev. 28, 1 (1969)

GUNTHER, F.A., R.C. BLINN:

Analysis of insecticides and acaricides.

Interscience Publishers, INC New York 1955

HAZLETON, L.W.:

Review of current knowledge of toxicity of cholinesterase inhibitor insecticides.

J. Agric. Food Chem. 3, 312 (1955)

HAZLETON, L.W., E.G. HOLLAND:

Pharmacology and toxicology of Parathion.

In: Agricultural Control Chemicals. p. 31

American Chemical Society, Washington D.C. 1950

HAZLETON, L.W., E.G. HOLLAND:

Toxicity of Malathion. Summary of mammalian investigations.

Arch. Ind. Hyg. Occ. Med. 8, 399 (1953)

HITCHCOCK, M., S.D. MURPHY:

Enzymatic reduction of Parathion, Paraoxon and EPN by tissues from mammals, birds and fishes.

Biochem. Pharmac. 16, 1801 (1967)

HODGE, H.C., E.A. MAYNARD, L. HURWITZ, V. Di STEFANO, W.L. DOWNS, C.K. JONES, H.J. BLANCHET JR:

Studies of the toxicity and of the enzyme kinetics of ethyl-p-nitrophenyl thionobenzene phosphonate (EPN).

J. Pharmacol. Exp. Ther. 112, 29 (1954)

HODKIN, A.L.:

Ionenbewegung als Grundlage der Nervenleitung.

Angew. Chem. 76, 661 (1964)

JARCZYK, H.J.:

Der Einfluß von Esterasen in Insekten auf den Abbau von Phosphorsäureestern der E 605-Reihe.

Pflanzenschutz-Nachrichten "Bayer" 19, 1 (1966)

JEPPSON, L.R., F.A. GUNTHER:

Acaricide Residues on Zitrus-D foliage and fruits and their biological significance.

Residue Rev. 33, 101 (1970)

JOHNSON, M.K.:

The delayed neurotoxic effect of some organophosphorus compounds: identification of the phosphorylation site as an esterase.

Biochem. J. 114, 711 (1969)

JOHNSON, M.K.:

Organophosphorus and other inhibitors of brain "neurotoxic esterase" and the development of delayed neurotoxicity in hens.

Biochem. J. 120, 523 (1970)

JOHNSON, M.K.:

The primary biochemical lesion leading to the delayed neurotoxic effects of some organophosphorus esters.

J. Neurochem. 23, 785 (1974)

JOHNSON, M.K.:

The delayed neuropathy caused by some organophosphor-esters: Mechanism and challenge. p. 289

Critical Reviews in Toxicology. CRC Press Inc. 1975

JOHNSON, M.K., R. LAUWERYS:

Protection by some carbamates against the delayed neurotoxic effects of di-iso-propyl phosphorofluoride.

Nature (London) 222, 1066 (1969)

KELLER, J.C., H.C. CHAPMANN:

Test of selected insecticides against resistant
Salt-Marsh mosquito larvae.

J. Econ. Entomol. 46, 1004 (1953)

KENNEDY, G.L. JR., J.A. DRESSLER, M.L. KEPLINGER:

Failure of Hexachlorophene to alter hepatic detoxi-
fication enzyme activity.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 14, 319 (1975)

KHERA, K.S., Q.N. LAHAM, C.F.G. ELLIS, Z.Z. ZAWIDZKA,
H.C. GRICE:

Foot deformity in ducks from injection of EPN during
embryogenesis.

Toxicol. Appl. Pharmacol. 9, 540 (1966)

KINNEAR, A.M., E.A. PERREN:

Formation of organo phosphorus compounds by the reaction
of alacyl chlorides with phosphorus trichloride in the
presence of aluminium chloride.

J. Chem. Soc. 3437 (1952)

KNAAK, J.B., R.D. O'BRIEN:

Effect of EPN on in vivo metabolism of Malathion by
the rat and dog.

J. Agric. Food Chem. 8, 193 (1960)

KOSHLAND, D.E.:

Correlation of structure and function in enzym action.
Science 142, 1533 (1963)

KRAMPL, V., A. HLADKA:

Dose-dependent extent microsomal enzyme induction by
Aldrin and Dieldrin in rats.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 14, 571 (1975)

KREITZER, J.F., J.W. SPANN:

Test of pesticidal synergism with young pheasant and Japanese quail.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 9, 250 (1973)

LIEUX, D.B., J.A. MULRENNAN:

By: A.W.A. Brown. The spread of insecticide resistance in pest species.

Advances in Pest Control Research, Interscience Publishers, Inc. New York 1958

LOROT, C.:

Les combinaisons de la créosote dans le traitement de la tuberculose pulmonaire.

Thesis, Paris 1899

LUDEWIG, R., K.H. LOHS:

Akute Vergiftungen.

Gustav Fischer Verlag, Jena 1966

MACEK, K.J.:

Acute toxicity of pesticide mixtures to Bluegills.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 14, 648 (1975)

MAIN, A.R.:

Affinity and phosphorylation constants for the inhibition of esterases by organophosphates.

Science 144, 992 (1964)

MEHIROTRA, K.N., A. PHOKELA:

A comparison of the affinity, phosphorylation and bimolecular rate constants of cholinesterases by organophosphates.

Arch. Int. Physiol. 77, 799 (1969)

MELNIKOV, N.N.:

Chemistry of pesticides.

Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York 1971

METCALF, R.L., R.B. MARCH:

The isomerization of organic Thionophosphate insecticides.

J. Econ. Entomol. 46, 288 (1953)

MOELLER, H.C., J.A. RIDER:

Cholinesterase depression by EPN and Malathion.

Pharmacologist 2, 84 (1960)

MURPHY, S.D.:

Malathion inhibition of esterases as a determinant of Malathion toxicity.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 156, 352 (1967)

MURPHY, S.D., K.P. DUBOIS:

Quantitative measurement of inhibition of the enzymatic detoxification of Malathion and EPN.

Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 96, 813 (1957)

NACHMANSOHN, D.:

Proteins in bioelectricity: the control of ion movements across excitable membranes.

Proc. Nat. Acad. Sci. 61, 1034 (1968)

NEAL, R.A., K.P. DUBOIS:

Studies on the mechanism of detoxification of cholinergic Phosphorothionates.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 148, 185 (1965)

O'BRIEN, R.D.:

Insecticides action and metabolism.

Academic Press, New York-London 1967

OHKAWA, H., N. MIKAMI, Y. OKUNO, J. MIYAMOTO:
Stereospecificity in toxicity of the optical isomers
of EPN.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 18, 534 (1977)

PALMER, J.S.:

Toxicologic evolution of O-Ethyl-O-(p-nitrophenyl)-
phenylphosphonothioate in cattle and sheep.

J. Amer. Vet. Med. Ass. 164, 936 (1974)

PERKOW, B.W.:

Die Insektizide.

Dr. Alfred Hüthig Verlag, Heidelberg 1968

PETTY, C.S.:

Organic phosphate insecticide poisoning. Residual
effects in two cases.

Amer. J. Med. 24, 467 (1958)

PLAZEK, E.:

Versuche über Chlorierung und Nitrierung in methyl-
alkoholischem Medium.

Roczniki Chem. 10, 761 (1930)

POULSEN, E., W.N. ALDRIDGE:

Studies on esterases in the chicken central nervous
system.

Biochem. J. 90, 182 (1964)

RACHAMAN, E.S., Y. ASHANI, H. LEADER, J. GRANOTH,
H. EDERY, G. PORATH:

Sugar-oximes, new potential antidotes against
organophosphorus poisoning.

Arzneim. Forsch. 29, 875 (1979)

RADELEFF, R.D., G.T. WOODARD:

Toxicity of organo-phosphorus insecticides to Livestock.
J. Amer. Vet. Med. Ass. 130, 215 (1957)

ROSENBERG, P., J.M. COON:

Potentiation between cholinesterase inhibitors.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 97, 836 (1958)

ROSENBERG, P., J.M. COON:

Nikethamide, nocotinamide and some related compounds
in anticholinesterase poisoning.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 128, 289 (1960)

SATOH, T., K. MOROI:

Comparative studies on the inhibition of liver amidases
aminopeptidase and serum cholinesterase by EPN.
Toxicol. Appl. Pharmacol. 25, 553 (1973)

SCHRADER, G.:

Die Entwicklung neuer Insektizide auf der Grundlage
organischer Fluor- und Phosphorverbindungen.
Verlag Chemie, Weinheim 1952

SCHRADER, G.:

Chlorthion: ein neues, wenig giftiges Insektizid
aus der Reihe der Thiophosphorsäureester.
Angew. Chem. 10, 265 (1954)

SMITH, F.F., F.E. EDWARDS, P. GIANG, R.A. FULTON:

Residues of organic phosphorus compounds and DDT
on greenhouse vegetables.
J. Econ. Entomol. 45, 703 (1952)

SMITH, H.V., J.M.K SPALDING:

Outbreak of paralysis in Morocco due to ortho-cresyl phosphate poisoning.

Lancet 277, 1019 (1959)

SMITH, M.J., E. ELVOVE, W.H. FRAZIER:

The pharmacological action of certain phenol esters with special reference to the etiology of so - called ginger paralysis.

U.S. Public Health Rep. 45, 2509 (1930)

SUN, Y.P., E.R. JOHNSON:

Synergistic and antagonistic action of insecticide-synergist combinations and their mode of action.

J. Agr. Food Che. 8, 261 (1960)

TASCHENBERG, E.F., W.A. AVENS:

Parathion and EPN residue studies on concord grapes.

J. Econ. Entomol. 53, 441 (1960)

TRIOLO, A.J., J. M. COON:

The protective effect of aldrin against the toxicity of organophosphate anticholinesterases.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 154, 613 (1966)

ULLMANN, F.:

Ullmanns Enzyklopädie der technischen Chemie, Band 13.

Urban & Schwarzenberg Verlag, München-Berlin 1962

VRBOVSKY, L., F.V. SELECKY, L. ROSIVAL:

Toxicologische und pharmakologische Studien der Phosphorsäure-Ester-Insektizide.

Arch. exp. Path. Pharmac. 236, 202 (1959)

WAGSTOFF, D.J.:

Enhancement of hepatic detoxification enzyme activity by dietary mercuric acetate.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 9, 10 (1973a)

WAGSTOFF, D.J.:

Stimulation of liver detoxication enzymes by dietary cadmium acetate.

Bull. Environ. Contam. Toxicol. 10, 328 (1973b)

WELCH, R.M., J.M. COON:

Studies on the effect of chlorcyclizine and other drugs on the toxicity of several organophosphate anticholinesterases.

J. Pharmacol. Exp. Ther. 143, 192 (1964)

WITTER, R.F., T.B. GAINES:

Relationship between depression of brain or plasma cholinesterase and paralysis in chickens caused by certain organic phosphorus compounds.

Biochem. Pharmacol. 12, 1377 (1963)

Herrn Professor Dr. H.-B. Wuermeling, Vorstand des
Instituts für Rechtsmedizin der Universität Erlan-
gen-Nürnberg danke ich für die freundliche Übernahme
des Korreferates.

Mein besonderer Dank gilt Frau Professor Dr. Dr. M.
Geldmacher-v.Mallinckrodt für die Überlassung des
Themas, ihre große Hilfsbereitschaft und den zu je-
der Zeit freundlich erteilten Rat.

Lebenslauf

Am 22.11.1947 wurde ich als Sohn des Diplomkaufmanns Friedrich Schulze und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Lögler, in Nürnberg geboren.

In den Jahren 1953 bis 1957 besuchte ich die Volksschule, anfangs in Gräfenberg, dann in Nürnberg.

Nach der 4. Klasse wechselte ich in das Melanchthon-Gymnasium Nürnberg über. Dort blieb ich bis zur 8. Klasse, ging anschließend in das Landschulheim Schloß Gaibach und legte dort im Jahre 1969 die Reifeprüfung ab.

Vom Wintersemester 1969 bis zum Sommersemester 1971 studierte ich Jura in Erlangen.

Im Wintersemester 1971 begann ich das Studium der Medizin an der Universität Würzburg. Nach 5 Semestern legte ich das Physikum ab.

1978 beendete ich das Medizinstudium mit der Approbation. Ab Juni 1978 arbeitete ich als Assistenzarzt auf der Chirurgischen Abteilung des Kreiskrankenhauses Lichtenfels.

Im Mai 1979 wechselte ich in den Staatsdienst über und bin seither am Staatlichen Gesundheitsamt Forchheim tätig.

Seit dem 22.11.1979 bin ich mit Gabriele Schneider verheiratet.



